



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/47, 14/11, A61K 39/145, 38/17, G01N 33/68	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/50423 (43) Date de publication internationale: 12 novembre 1998 (12.11.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00923 (22) Date de dépôt international: 7 mai 1998 (07.05.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/05677 7 mai 1997 (07.05.97) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): CEN- TRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR]; 39, rue Raphaël, F-92170 Vanves (FR). GUICHARD, Gilles [FR/FR]; 6, quai Matthis, F-67000 Strasbourg (FR). OSTANKOVITCH, Marina [FR/FR]; 89, rue Broca, F-75013 Paris (FR). CONNAN, Francine [FR/FR]; 21, rue du Progrès, F-95170 Deuil-La-Barre (FR). QUESNEL, Anne [FR/FR]; 13A, boulevard de Lyon, F-67000 Strasbourg (FR). CHOPPIN, Jeannine [FR/FR]; 8, rue Saint Fiacre, F-51100 Reims (FR). BRIAND, Jean-Paul [FR/FR]; 22, rue des Balayeurs,	F-67000 Strasbourg (FR). MULLER, Sylviane [FR/FR]; 15, avenue de la Forêt Noire, F-67000 Strasbourg (FR). (74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 103, rue La Fayette, F-75481 Paris Cedex 10 (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si de telles modifications sont</i> <i>reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 19 août 1999 (19.08.99)	
(54) Title: PEPTIDE ANALOGUES, AND THEIR USES IN PARTICULAR IN PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND FOR DIAGNOSIS		
(54) Titre: ANALOGUES PEPTIDIQUES ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS DES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET POUR LE DIAGNOSTIC		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns the use of parent peptide analogues, characterised in that they correspond to said parent peptide in which: at least a peptide bond -CO-NH- of the peptide chain, is modified, except for retro or retro-inverso type modifications; or at least an amino acid of the peptide chain, is substituted by a non-proteinogenic amino acid; or at least a peptide bond -CO-NH- of the peptide chain is substituted by a non proteinogenic amino acid. Said peptide analogues are used for: preparing medicines for preventing or treating the pathologies mentioned in the description; or preparing a composition for diagnosing said pathologies, or for assessing <i>in vivo</i> the immune response concerning said pathologies, using a hypersensitivity cutaneous reaction by intradermal injection of said composition; or implementing an <i>in vitro</i> diagnostic method of said pathologies.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention a pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques de peptides parents, caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels: au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de ladite chaîne peptidique est substitué par un acide non protéinogénique, pour: la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies susmentionnées, ou la préparation d'une composition destinée au diagnostic <i>in vivo</i> des pathologies susmentionnées, ou à l'évaluation <i>in vivo</i> de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite composition, ou la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic <i>in vitro</i> desdites pathologies.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

ANALOGUES PEPTIDIQUES ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS DES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET POUR LE DIAGNOSTIC

5 La présente invention a pour objet des analogues peptidiques et leurs utilisations, principalement dans le domaine de la préparation de compositions pharmaceutiques, notamment de vaccins, et pour le diagnostic *in vitro* ou *in vivo* de diverses pathologies.

10 Le développement des neuropeptides, des hormones peptidiques et des antibiotiques à base de peptides, ou des vaccins synthétiques à base de peptides, est fortement perturbé par la grande sensibilité des peptides vis à vis de la protéolyse qui limite, entre autres, l'administration orale et parentérale.

15 Les pseudopeptides représentent une classe de molécules particulièrement intéressante dans la conception d'inhibiteurs d'enzymes. Le clivage par les peptidases est impliqué dans une variété de processus biologiques puisqu'il permet de générer à partir de précurseurs inactifs des fragments protéiques ou peptidiques actifs. L'idée qu'un lien isostère pouvait être considéré comme un mine de l'intermédiaire tétraédrique formé lors du passage par l'état de transition, a ouvert la voie des inhibiteurs de type pseudopeptidiques. Au début des années 80, cette
20 approche a été utilisée avec succès dans le développement d'inhibiteurs puissants de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), de la rénine (Szelke *et al.*, 1982 ; Boger *et al.*, 1983) et de la protéase aspartique du VIH (Huff, 1991). Plus récemment, plusieurs inhibiteurs pseudopeptidiques sélectifs de la Ras farnesyl transférase ont été proposés. Ces molécules présentent un intérêt thérapeutique
25 potentiel dans le traitement des cancers impliquant l'oncogène Ras muté (Buss & Marsters, 1995).

Les analogues pseudopeptidiques d'hormones peptidiques ont également fait l'objet de nombreuses études avec pour objectif premier la stabilisation du peptide de départ et une conservation de l'activité. Cette stratégie a effectivement permis
30 la découverte d'agonistes puissants (Chorev *et al.*, 1979 ; Nagain *et al.*, 1988 ; Doulut *et al.*, 1992), mais aussi d'agonistes partiels et même d'antagonistes de l'hormone étudiée (Martinez *et al.*, 1985 ; Coy *et al.*, 1989 ; Leban *et al.*, 1993 ; Cai *et al.*, 1994). Des analogues plus sélectifs au niveau d'un récepteur ont aussi été obtenus dans certains cas (Mendre, 1988 ; Nagain *et al.*, 1988 ; Schiller *et al.*,
35 1993). Par ailleurs, la liaison pseudopeptidique permet d'explorer les caractéristiques conformationnelles du ligand au niveau du site modifié et, d'évaluer la contribution de la liaison amide et des liaisons hydrogènes inter- ou intramoléculaires dans l'interaction avec le ou les récepteurs.

Toutefois, les modifications effectuées jusqu'à présent sur les peptides à usage immunologique se limitent essentiellement à l'adjonction de sucres, à celle d'acides gras plus ou moins longs pour permettre l'émulsion des lipopeptides résultants, à la cyclisation par formation de ponts disulfure ou covalents, ainsi qu'à l'adjonction de molécules telles que la biotine, pour augmenter, par exemple, la sensibilité des tests immunochimiques en phase solide.

Plusieurs auteurs ont affirmé que les pseudopeptides possèdent probablement très peu ou pas d'immunogénicité, puisqu'ils ne pouvaient pas être transformés et présentés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour être reconnus par les cellules T auxiliaires ou par les lymphocytes T cytotoxiques. C'est ainsi que Dintzis *et al.* ont décrit que l'énantiomère L de la rubrexodine induit une forte réponse immunitaire par production d'immunoglobulines d'isotype G (IgG), tandis que la protéine correspondante constituée d'acides aminés tous de configuration D, n'induit pas de réponse immunitaire.

C'est dans ce contexte que les immunorétroïdes décrits ci-après, ainsi que les anticorps dirigés contre ces derniers, ont été décrits dans la demande internationale WO 95/24916, comme étant utilisables dans le domaine de la vaccination contre des pathologies dans lesquelles les peptides dont ils dérivent (peptides parents) étaient impliqués, ainsi que pour le diagnostic de ces pathologies.

Les auteurs de cette demande internationale, qui sont également les auteurs de la présente demande, avaient en effet, pour la première fois, mis en évidence que la modification par remplacement d'une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique d'un peptide, par une liaison -NH-CO-, et, le cas échéant par remplacement d'un acide aminé de configuration L par un acide aminé de configuration D, permet d'obtenir des analogues peptidiques (rétro ou rétro-inverso respectivement) susceptibles d'être utilisés dans le cadre du traitement de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation humorale ou cellulaire.

Les immunorétroïdes susmentionnés sont des composés du type peptidique, à savoir des composés constitués d'une chaîne d'acides aminés protéinogéniques, dont l'une au moins des liaisons -CO-NH-, et avantageusement toutes les liaisons -CO-NH-, de la chaîne peptidique du peptide parent correspondant, (ne comportant pas de liaison -NH-CO- dans sa chaîne peptidique), est (sont) remplacée(s) par une (des) liaison(s) -NH-CO-, la chiralité de chaque résidu aminoacycle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons -NH-CO- susmentionnées, étant soit conservée (peptide rétro), soit inversée (peptide rétro-inverso) par rapport aux résidus aminoacycles correspondants constituant ledit peptide parent.

Par peptides rétro-inverso, il faut entendre tout peptide et analogue peptidique répondant à la définition donnée ci-dessus des immunorétroïdes, ledit

peptide étant plus particulièrement constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus d'une part est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, et d'autre part, est de chiralité opposée à celle de ce même résidu aminoacyle dans la chaîne peptidique du peptide parent.

5 Par peptide rétro, il faut entendre tout peptide répondant à la définition donnée ci-dessus des immunorétroïdes, ledit peptide étant plus particulièrement constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus, est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, la chiralité de la totalité des résidus aminoacyles impliqués dans au moins une liaison -NH-CO- étant conservée
10 par rapport au résidu correspondant de la chaîne peptidique du peptide parent.

Il va de soi que les liaisons -CO-NH- et -NH-CO- doivent être prises en compte dans ce qui précède et ce qui suit, dans le sens de la chaîne peptidique parente allant de l'extrémité aminoterminal (N-terminale) vers l'extrémité carboxyterminale (C-terminale).

15 Compte tenu du contexte général d'incertitude sur l'efficacité des analogues peptidiques rappelé ci-dessus, les auteurs de cette demande internationale WO95/24916 avaient considéré que cette inversion du sens de la liaison amide entre les acides aminés protéinogéniques, et/ou la modification de la configuration des acides aminés protéinogéniques, représentaient les seules modifications
20 possibles des peptides parents pour obtenir des analogues peptidiques présentant une demi-vie supérieure, et des propriétés biologiques, notamment immunologiques, comparables, voire supérieures, à celles des peptides parents susmentionnés.

Or, la présente invention découle de la découverte faite par les auteurs de la présente demande que, contrairement à ce qu'ils avaient cru bon de déduire dans le
25 cadre de leur invention précédente en raison du contexte général rappelé ci-dessus, ces modifications du type rétro ou rétro-inverso de la chaîne peptidique des peptides parents, ne représentent pas les seules modifications possibles permettant d'obtenir des analogues peptidiques d'intérêt, du moins dans le cadre du diagnostic
30 et/ou du traitement de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

En effet, les auteurs de la présente demande ont mis en évidence que la modification de peptides naturels impliqués dans des pathologies dans lesquelles intervient l'immunité à médiation cellulaire, et plus particulièrement les
35 lymphocytes T cytotoxiques, par remplacement des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique desdits peptides naturels par d'autres liaisons encore que la liaison -NH-CO-, et/ou par remplacement des acides aminés protéinogéniques du peptide naturel par des acides aminés non protéinogéniques, permet d'obtenir des analogues peptidiques desdits peptides naturels pouvant être utilisés avec les

avantages susmentionnés dans le cadre du traitement ou du diagnostic desdites pathologies.

Par "acide aminé protéinogénique", on entend, dans ce qui précède et ce qui suit, tout acide aminé entrant dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

Par "acide aminé non protéinogénique", on entend par opposition à la définition précédente, tout acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel. On entend plus particulièrement par "acide aminé non protéinogénique", tout acide aminé dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe -CHR-, situé entre -CO- et -NH- dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

La présente invention a pour but de fournir des compositions pharmaceutiques, et plus particulièrement des vaccins, comprenant des analogues peptidiques présentant une demi vie nettement supérieure à celle des peptides naturels ou des protéines naturelles, ou à celle des peptides de synthèse issus ou non de ces protéines naturelles (ces protéines naturelles, ou peptides issus ou non de ces dernières, étant encore désignés dans ce qui suit par l'expression "protéines ou peptides parents"), dont ils sont les analogues, tout en présentant une activité biologique, et plus particulièrement immunologique, comparable, voire même supérieure, à celle des protéines ou peptides parents susmentionnés, ou encore une activité différente ou opposée à celle desdites protéines ou peptides parents.

Un autre but de la présente invention est de fournir des méthodes de diagnostic *in vivo* ou encore d'évaluation *in vivo* de la capacité de la réponse immunitaire d'un individu dans le cadre de pathologies dans lesquelles des peptides naturels ou protéines naturelles (exogènes ou endogènes) sont susceptibles d'intervenir en se liant aux molécules du CMH, les complexes peptides-CMH ainsi obtenus se aux récepteurs situés sur les cellules T et reconnaissant lesdits peptides naturels ou protéines naturelles sous leur forme complexée avec lesdites molécules du CMH.

L'invention a également pour but de fournir des compositions et des trousse (ou kits) pour la mise en oeuvre des méthodes de diagnostic ou d'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire susmentionnées.

La présente invention a également pour but de fournir des méthodes de diagnostic *in vitro* de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un individu de protéines endogènes ou exogènes, ces méthodes étant réalisées à l'aide des analogues peptidiques tels que définis ci-dessus, ou à l'aide d'anticorps dirigés contre les complexes entre ces anticorps et les molécules de CMH, et présentant l'avantage d'être plus performantes que les méthodes de diagnostic actuelles

réalisées à l'aide des peptides ou protéines parents, ou à l'aide d'anticorps dirigés contre ces derniers.

La présente invention a également pour but de fournir de nouveaux kits pour la mise en oeuvre de telles méthodes de diagnostic *in vitro*.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents interagissant avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies impliquant une réponse immunitaire à médiation cellulaire, chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de ladite chaîne peptidique est substitué par un acide aminé non protéinogénique,

pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies susmentionnées.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'analogues peptidiques issus de peptides parents interagissant avec des molécules du CMH de classe I, dans le cadre de pathologies impliquant les lymphocytes T cytotoxiques.

Avantageusement, les analogues peptidiques utilisés dans le cadre de la présente invention, et plus particulièrement ceux issus de peptides parents interagissant avec des molécules du CMH de classe I, correspondent auxdits peptides parents dans lesquels au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique, est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso.

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, il faut entendre par l'expression "peptide parent" susmentionnée,

- soit un peptide existant tel quel à l'état naturel, notamment dans un micro-organisme ou dans un organisme supérieur (notamment dans l'organisme humain),

- soit tout peptide d'intérêt immunologique obtenu par synthèse peptidique, à partir d'acides aminés protéinogéniques,

- soit un peptide issu d'une protéine telle qu'elle existe à l'état naturel dans les organismes susmentionnés, notamment par fragmentation de ladite protéine (notamment à l'aide de protéases appropriées, puis purification du peptide en

question), ou par synthèse peptidique (selon les méthodes classiquement utilisées dans ce domaine)

- soit un peptide issu d'une protéine telle qu'elle existe à l'état naturel mais dont l'activité immunologique a été modifiée, conservée ou optimisée par remplacement de certains amino acides de la séquence naturelle par des acides aminés protéinogéniques, par exemple à la suite d'un criblage d'une librairie de peptides analogues obtenue par synthèse peptidique.

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits peptides parents pouvant interagir avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique $-CO-NH-$ de la chaîne peptidique est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique $-CO-NH-$ de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide non protéinogénique.

Avantageusement, les analogues peptidiques susmentionnés de l'invention sont caractérisés en ce que le nombre de résidus aminoacyles protéinogéniques ou non, et reliés par une liaison modifiée ou non, est compris entre environ 5 et environ 20, de préférence entre 8 et 12 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe I, et de préférence entre 8 et 16 pour les analogues peptidiques se liant aux molécules du CMH de classe II.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques $-CO-NH-$ de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison $-CO-NH-$, ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les suivantes :

$-CH_2-NH-$ (méthylène amino) ;

$-CH_2-CH_2-$ (carba) ;

$-CO-CH_2-$ (cétométhylène) ;

$-CH_2-O-$ (méthylène-oxy) ;

$-CHOH-CH_2-$ (hydroxyéthylène) ;

$-CHOH-CHOH-$ (di-hydroxyéthylène) ;

$-CH=CH-$ (E ou Z oléfine) ;

$-CHCN-NH-$ (cyanométhylène amino) ;

$-S-CH_2-$ (thiométhylène) ;

-CH₂-S- (méthylène thio) ;

-CS-NH- (thioamide) ;

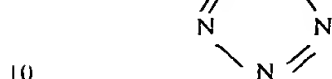
-PO₂-NH- (phosphonamide) ;

-CHOH- (hydroxyméthylène) ;

5 -NH-CO-NH- (urée) ;

-CH—CH- (oxirane) ;


-C—N- (tétrazole) ;



-CH₂-CO-NH- (β-homologation) ;

-CHOH-CH₂-NH- (hydroxyéthylène amino) ;

-CO-NH-NH- (hydrazino).

15 L'invention a également pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus, et caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison du type rétro ou rétro-inverso telle que définie ci-dessus, dans le cas où l'un au moins des acides aminés dudit analogue peptidique est un acide aminé non
 20 protéinogénique.

Des analogues peptidiques préférés dans le cadre de la présente invention sont caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique ou peptide parent est remplacée par une liaison méthylène amino, ou du type β-homologation, ou carba, ou cétométhylène, ou
 25 cyanométhylène amino, ou hydroxyéthylène amino.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques de peptides parents impliqués dans le mélanome, notamment le peptide MART1 27-35, ledit peptide parent comportant, le cas échéant, une ou plusieurs mutations, tel que le peptide parent muté MART1 27-35 Leu²⁸, lesdits analogues peptidiques
 30 correspondant auxdits peptides parents dans lesquels l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso.

A ce titre l'invention concerne plus particulièrement les analogues peptidiques du peptide parent Mart-1 27-35 du mélanome, comportant une liaison
 35 méthylène amino et répondant aux formules suivantes :

		Séquences																		
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9										
	MART1 27-35	H-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH		
	Ψ(1-2)	H-A	Ψ(CH ₂ NH)	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH	
5	Ψ(2-3)	H-	A-	A	Ψ(CH ₂ NH)	G-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH		
	Ψ(3-4)	H-	A	-	A	-	G	Ψ(CH ₂ NH)	I-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH	
	Ψ(4-5)	H-	A	-	A	-	G	-	I	Ψ(CH ₂ NH)	G-	I	-	L	-	T	-	V	-OH	
	Ψ(5-6)	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	Ψ(CH ₂ NH)	I-	L	-	T	-	V	-OH	
	Ψ(6-7)	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	Ψ(CH ₂ NH)	L-	T	-	V	-OH	
	Ψ(7-8)	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	Ψ(CH ₂ NH)	T	-	V	-OH
10	Ψ(8-9)	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	Ψ(CH ₂ NH)	V	-OH

Ces analogues peptidiques ψ (1-2), ψ (2-3), ψ (3-4), ψ (4-5), ψ (5-6), ψ (6-7), ψ (7-8) et ψ (8-9), encore désignés peptides réduits analogues de Mart-1 27-35, correspondent à ce dernier peptide dans lequel la liaison -CO-NH- située entre les résidus P1 et P2, P2 et P3, P3 et P4, P4 et P5, P5 et P6, P6 et P7, P7 et P8, P8 et P9 est remplacée respectivement par une liaison -CH₂-NH-.

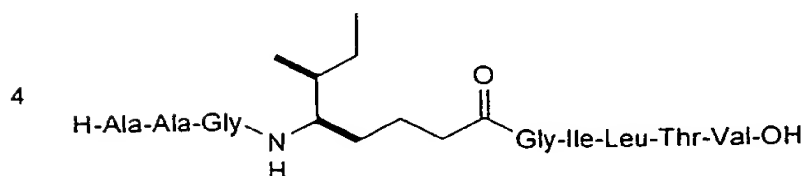
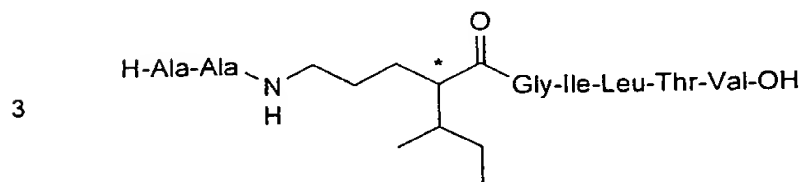
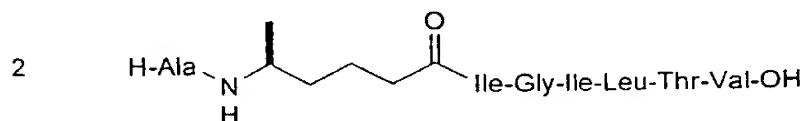
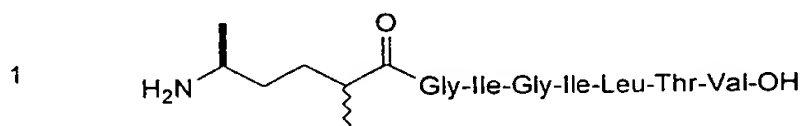
L'invention a également pour objet les analogues peptidiques du peptide parent Mart-1 27-35 du mélanome, comportant une liaison du type β-homologation et répondant aux formules suivantes :

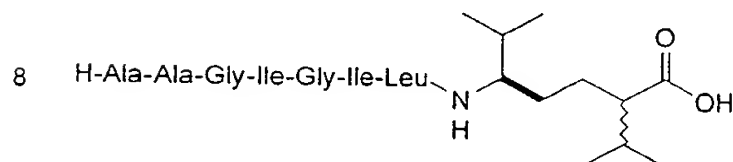
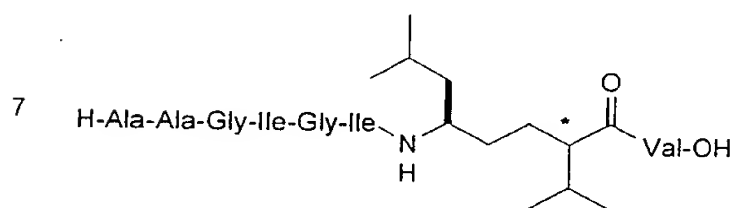
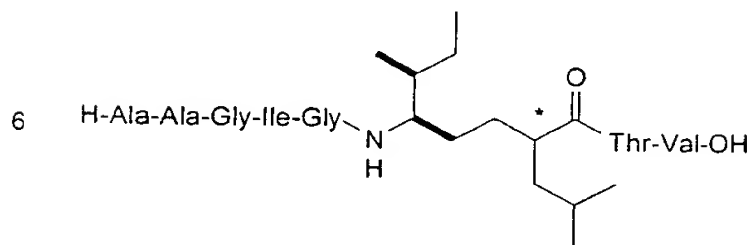
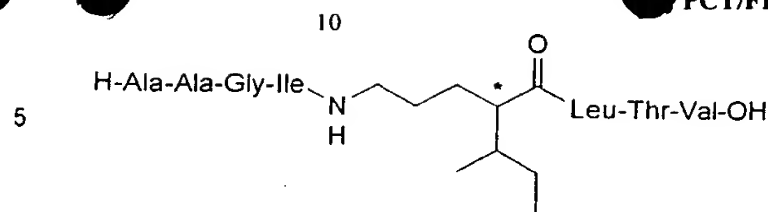
		Séquences								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
25	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
	β1	H-β-homoA	-A-	G-	I-	G-	I-	L-	T-	V -OH
	β2	H- A-β-homoA-	G-	I-	G-	I-	L-	T-	V -OH	
	β3	H- A	- A	-β-homoG	-I-	G-	I-	L-	T-	V -OH
30	β4	H- A	- A	- G	-β-homoI	-G	- I	- L	- T	- V -OH
	β5	H- A	- A	- G	- I	-β-homoG	-I	- L	- T	- V -OH
	β6	H- A	- A	- G	- I	- G	-β-homoI	-L	- T	- V -OH
	β7	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	-β-homoL	-T	- V -OH
	β8	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	-β-homoT	-V -OH
	β9	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	-β-homoV -OH

Ces analogues peptidiques $\beta 1$ à $\beta 9$ de Mart-1 27-35 correspondent à ce dernier peptide dans lequel la liaison $-\text{CO}-\text{NH}-$ située entre les résidus P1 et P2, P2 et P3, P3 et P4, P4 et P5, P5 et P6, P6 et P7, P7 et P8, P8 et P9, est remplacée respectivement par une liaison $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$.

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques du peptide parent muté Mart-1 27-35 Leu²⁸, correspondant au peptide Mart-1 27-35 dans lequel l'alanine en position 28 est remplacée par la leucine, et comportant une liaison du type β -homologation entre les mêmes résidus que dans le cas décrit ci-dessus des analogues peptidiques $\beta 1$ à $\beta 9$.

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques de MART1 27-35 dont l'une au moins des liaisons $-\text{CO}-\text{NH}-$ est remplacée par une liaison $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, tels que les analogues 1 à 8 suivants (encore désignés pseudopeptides carba analogues de MART):





L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques des peptides parents du virus de la grippe, notamment du peptide parent M58-66, lesdits analogues peptidiques correspondant auxdits peptides parents dans lesquels l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso ; avantageusement, lesdits analogues sont choisis parmi ceux dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-NH-, tels que les analogues suivants :

		Séquences								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
30	M58-66	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(1-2)	H-G	Ψ(CH ₂ NH)L	- L	- G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(2-3)	H- G	- L	Ψ(CH ₂ NH)L	- G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(3-4)	H- G	- L	- L	Ψ(CH ₂ NH)G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
35	Ψ(4-5)	H- G	- L	- L	- G	Ψ(CH ₂ NH)F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(5-6)	H- G	- L	- L	- G	- F	Ψ(CH ₂ NH)V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(6-7)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	Ψ(CH ₂ NH)F	- T	- L -OH
	Ψ(7-8)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	Ψ(CH ₂ NH)T	- L -OH
	Ψ(8-9)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	- T	Ψ(CH ₂ NH)L -OH

Ces analogues peptidiques ψ (1-2), ψ (2-3), ψ (3-4), ψ (4-5), ψ (5-6), ψ (6-7), ψ (7-8) et ψ (8-9), encore désignés peptides réduits analogues de M58-66, correspondent à ce dernier peptide dans lequel la liaison -CO-NH- située entre les résidus P1 et P2, P2 et P3, P3 et P4, P4 et P5, P5 et P6, P6 et P7, P7 et P8, P8 et P9 est remplacée respectivement par une liaison -CH₂-NH-.

L'invention a également pour objet les analogues peptidiques de peptides parents du virus du SIDA, notamment des peptides NEF 84-92, et GAG 77-85, lesdits analogues peptidiques correspondant auxdits peptides parents dans lesquels l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, lesdits analogues étant notamment choisis parmi :

- ceux dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-NH-, tels que les analogues NEFRD1-8 du peptide NEF, et GAGRD1-8 du peptide GAG suivants :

15			Pureté
	NEF	AVDLSHFLK	98%
	NEFRD1	A Ψ (CH ₂ -NH)VDLSHFLK	99%
	NEFRD2	AV Ψ (CH ₂ -NH)DLSHFLK	93%
	NEFRD3	AVD Ψ (CH ₂ -NH)LSHFLK	97%
20	NEFRD4	AVDL Ψ (CH ₂ -NH)SHFLK	98%
	NEFRD5	AVDLS Ψ (CH ₂ -NH)HFLK	86%
	NEFRD6	AVDLSH Ψ (CH ₂ -NH)FLK	98%
	NEFRD7	AVDLSHF Ψ (CH ₂ -NH)LK	92%
	NEFRD8	AVDLSHFL Ψ (CH ₂ -NH)K	91%
25			Pureté
	GAG	SLYNTVATL	96%
	GAGRD1	S Ψ (CH ₂ -NH)LYNTVATL	95%
	GAGRD2	SL Ψ (CH ₂ -NH)YNTVATL	95%
30	GAGRD3	SLY Ψ (CH ₂ -NH)NTVATL	95%
	GAGRD4	SLYN Ψ (CH ₂ -NH)TVATL	95%
	GAGRD5	SLYNT Ψ (CH ₂ -NH)VATL	95%
	GAGRD6	SLYNTV Ψ (CH ₂ -NH)ATL	95%
	GAGRD7	SLYNTVA Ψ (CH ₂ -NH)TL	95%
35	GAGRD8	SLYNTVAT Ψ (CH ₂ -NH)L	95%

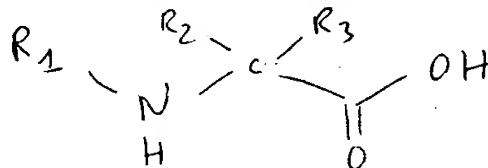
- ceux dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CHOH-NH-, tels que les analogues NEFHEA1-8 du peptide NEF suivants :

		Pureté	Masse
NEF	AVDLSHFLK		
NEFHFA1	AΨ(CHOH-NH)VDLSHFLK	98%	1046,50
NEFHFA2	AVΨ(CHOH-NH)DLSHFLK	95%	1046,56
5 NEFHFA3	AVDΨ(CHOH-NH)LSHFLK	83% + 15%	1029,00
NEFHFA4	AVDLΨ(CHOH-NH)SHFLK	98%	1047,97
NEFHFA5	AVDLSΨ(CHOH-NH)HFLK	99%	1047,08
NEFHFA6	AVDLSHΨ(CHOH-NH)FLK		
NEFHFA7	AVDLSHFΨ(CHOH-NH)LK	97%	1047,19
10 NEFHFA8	AVDLSHFLΨ(CHOH-NH)K	97%	1046,77

Des analogues peptidiques préférés dans le cadre de la présente invention sont caractérisés en ce que l'un au moins des acides aminés de la chaîne peptidique du peptide parent, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, tel que défini ci-dessus.

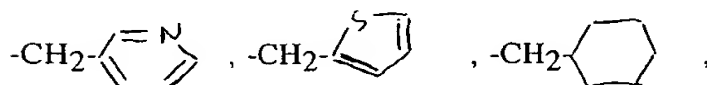
Avantageusement, les acides aminés non protéinogéniques utilisés sont choisis parmi les acides aminés suivants:

- les acides aminés de configuration D,
- les acides α-aminés de formule générale :



dans laquelle :

- R_1 , R_2 et R_3 , représentent indépendamment les uns des autres : un atome d'hydrogène, un hydroxyle, un radical alkyle de 1 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un groupe allyle et ayant de 3 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un ou plusieurs cycles aromatiques ou non, notamment un groupe aryle, et ayant de 6 à 25 atomes de carbone, et notamment les groupes suivants : -CH₃ (méthyl), -CH₂CH₃ (éthyl), -(CH₂)₄-CH₃, -CH(CH₃)₂ (isopropyl), -C(CH₃)₃ (tertiobutyl), -Φ (phényl), -CH₂Φ (benzyl), -CH₂ΦCl (para-chlorobenzyl), -CH₂-CH₂Φ (2-phényl-éthyl), -CH₂CHCH₂ (alkyl), méthylfluorényl, -CH₂CONH₂ (glycolamide), -CH₂CONΦ₂ (benzhydrylglycolamide), -CHOHΦ,

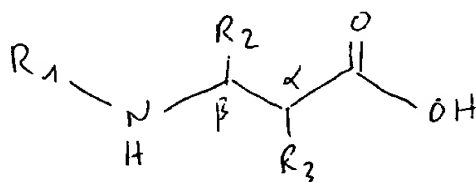


étant entendu que l'un des deux groupes R_2 et R_3 peuvent représenter une chaîne latérale d'acides aminés naturels lorsque soit R_1 , soit l'autre des deux groupes R_2 et R_3 ne représentent pas un atome d'hydrogène,

- le cas échéant, R_1 , R_2 , C_α et N forment un hétérocycle de 4 à 8 atomes de carbone, aromatique ou non, le cas échéant substitué, notamment un hétérocycle de formule :



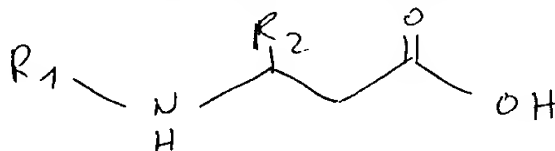
- les acides β -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 , indépendamment les uns des autres représentent une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou sont tels que définis ci-dessus,

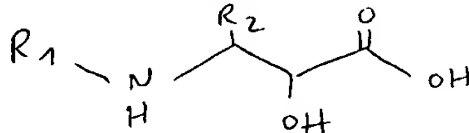
notamment :

- les β -homo amino acides de formule :



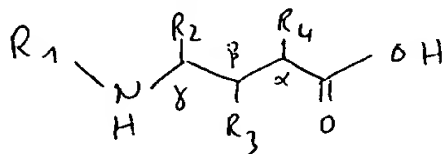
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus, ou

- les α -hydroxy β -homo amino acides de formule :



dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus,

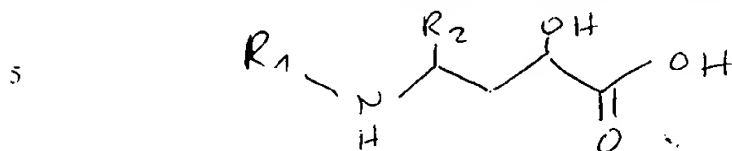
- les acides γ -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment les uns des autres une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou R_1 , R_2 et R_3 , sont tels que

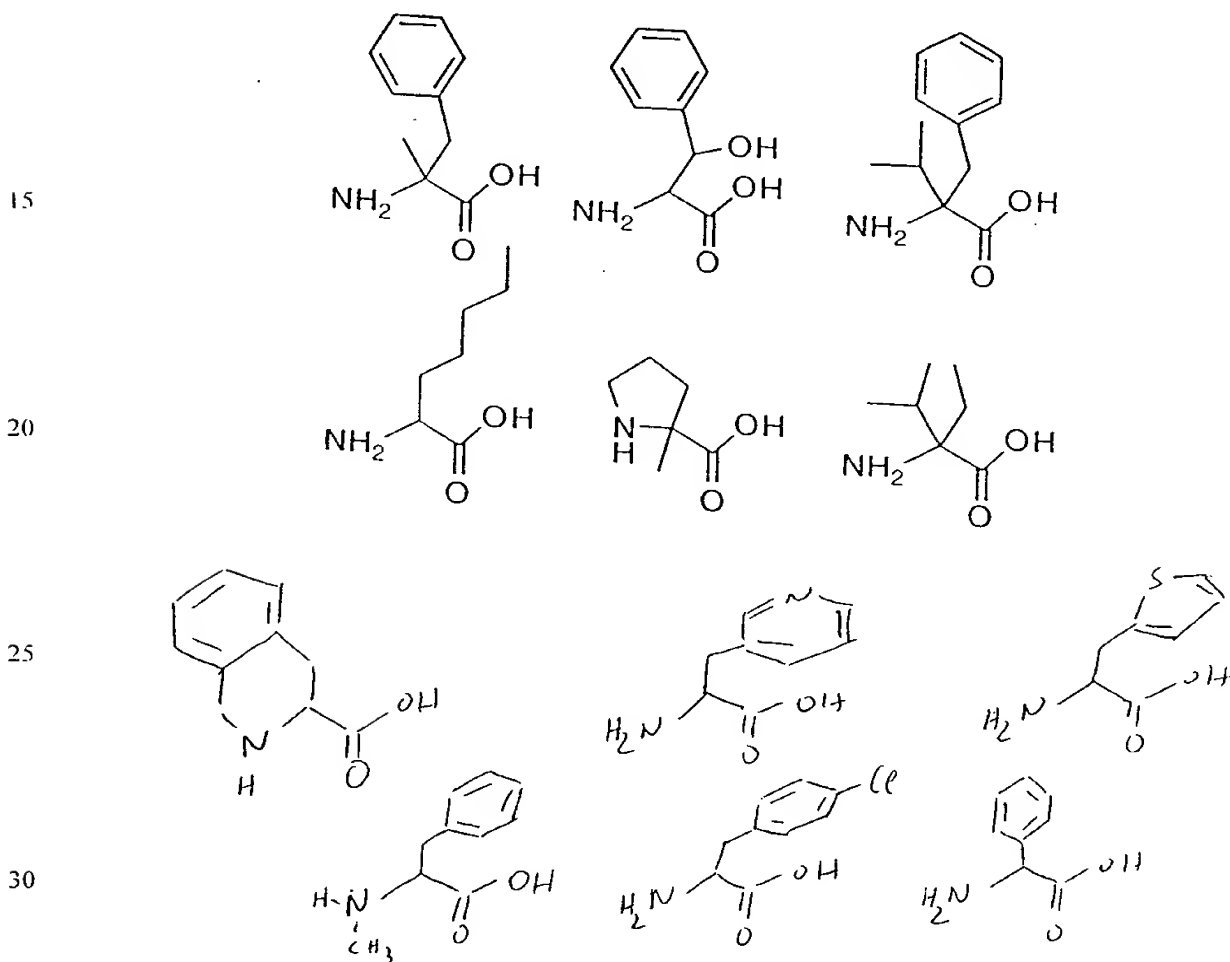
définis ci-dessus, et R_4 a la même signification que celle donnée ci-dessus pour R_1 , R_2 et R_3 ,

notamment les dérivés de statine de formule :



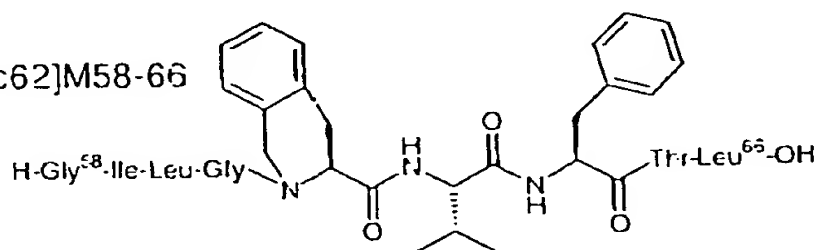
dans laquelle R_1 , et R_2 sont tels que définis ci-dessus.

Avantageusement, les acides aminés non protéinogéniques utilisés dans le cadre de la présente invention sont choisis parmi ;

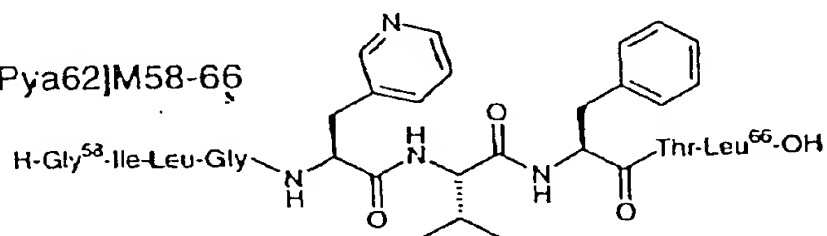


L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques des peptides parents du virus de la grippe, notamment du peptide parent M58-66, lesdits analogues peptidiques correspondant auxdits peptides parents dans lesquels l'un au moins des acides aminés de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, tels que les analogues suivants :

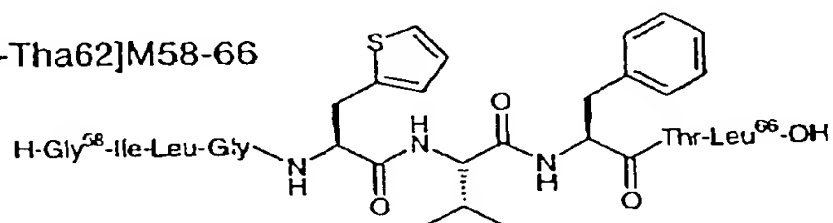
[Tic62]M58-66



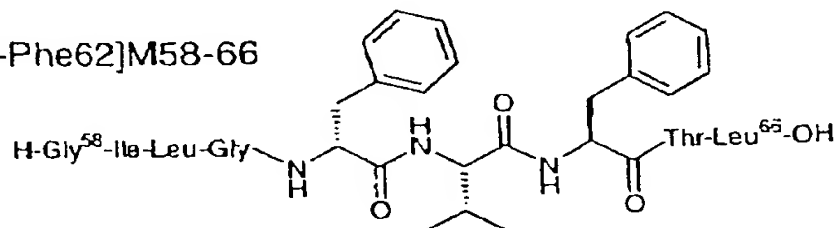
[3-Pya62]M58-66



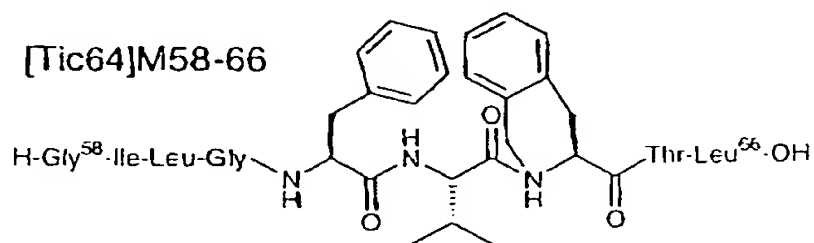
[2-Tha62]M58-66



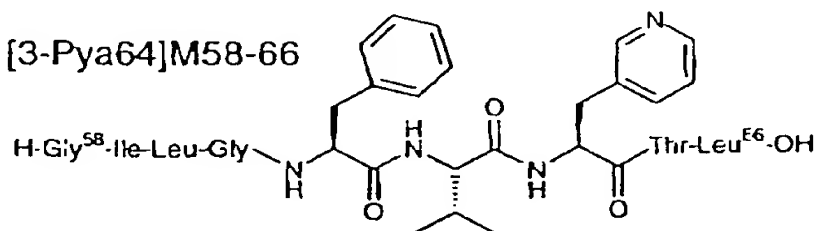
[D-Phe62]M58-66



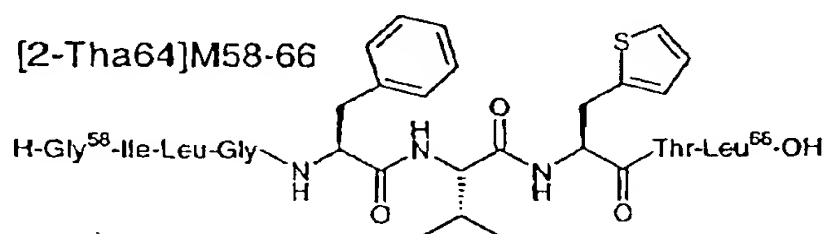
[Tic64]M58-66



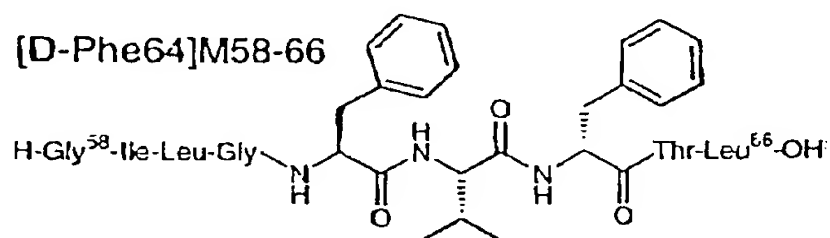
[3-Pya64]M58-66



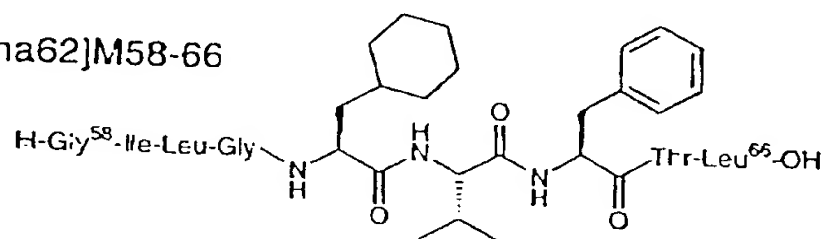
[2-Tha64]M58-66



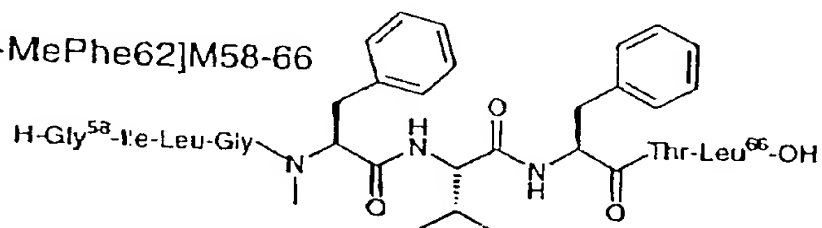
[D-Phe64]M58-66



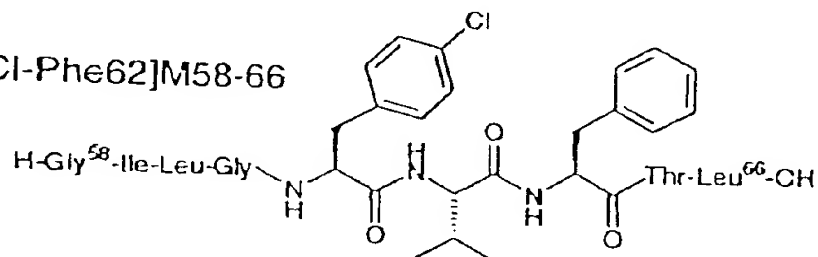
[Cha62]M58-66



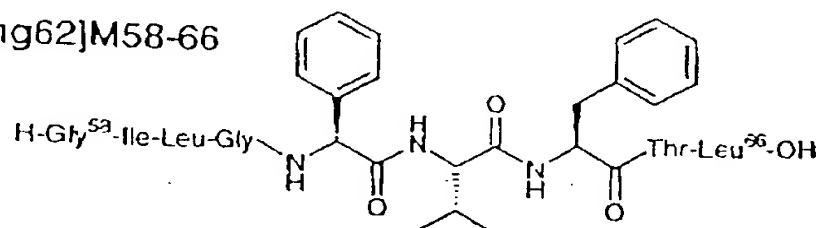
[N-MePhe62]M58-66

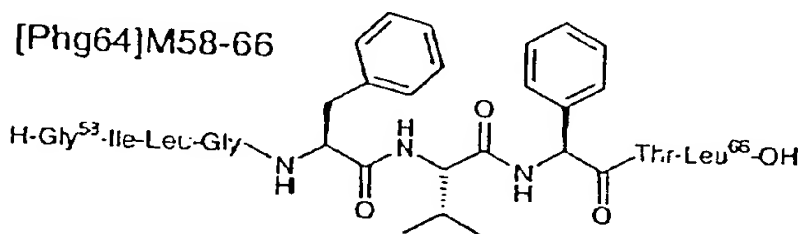
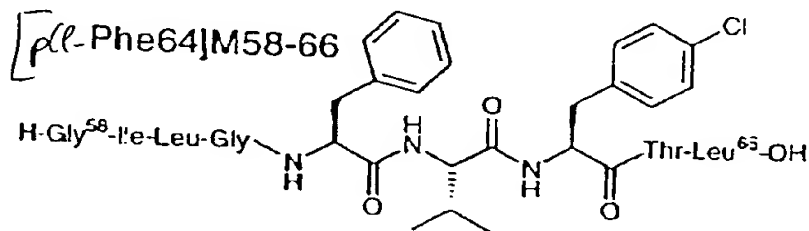
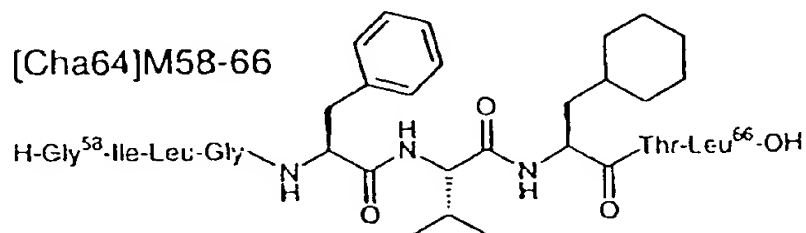


[pCl-Phe62]M58-66



[Phg62]M58-66





Avantageusement, les analogues peptidiques susmentionnés de l'invention sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'une part d'être reconnus par les molécules du CMH et de s'associer avec ces dernières, notamment par mise en oeuvre de la méthode suivante :

- incubation (notamment pendant environ 2 heures à 25°C, puis environ 12 heures à 4°C) de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

- addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du

CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

• détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet de reconnaissance et d'association entre les molécules du CMH et l'analogue peptidique étudié,

- et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en oeuvre d'une méthode de suivi dans le temps de la liaison établie entre l'analogue peptidique et les molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation de l'analogue peptidique en présence des molécules du CMH sur le support solide recouvert dudit premier anticorps, se fait (avantageusement à une température de 37°C) pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours.

Les analogues peptidiques de l'invention doivent être reconnus par les molécules de CMH et s'associer à ces dernières, notamment dans le cadre de la mise en oeuvre du test de reconnaissance décrit ci-dessus. Cette association peut être faible (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} M), intermédiaire (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} M), ou forte (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} M).

Les analogues peptidiques reconnus par les molécules du CMH dans le cadre de la présente invention sont de préférence susceptibles de se lier pendant au moins environ 30 minutes auxdites molécules du CMH.

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- d'induire *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant :

5 . soit des agonistes des récepteurs (TCR) reconnaissant l'antigène (à savoir le peptide parent) des cellules T cytotoxiques, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes ou des antagonistes desdits récepteurs,

10 . soit des agonistes partiels desdits récepteurs, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes desdits récepteurs, ces agonistes partiels induisant notamment la sécrétion d'une ou plusieurs cytokines différentes de celles dont la sécrétion est induite par les peptides parents.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux :

20 - susceptibles d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

25 - n'induisant pas *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

30 - n'induisant pas *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant des antagonistes des récepteurs des cellules T cytotoxiques.

35 L'invention a également pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques tels que définis ci-dessus pour la préparation de médicaments, notamment de vaccins, destinés à la prévention ou au traitement des pathologies dans lesquelles les peptides parents sont des agonistes ou antagonistes des récepteurs reconnaissant l'antigène des cellules T cytotoxiques, et plus particulièrement des pathologies neurodégénératives infectieuses (d'origine virale ou bactérienne), tumorales, auto-immunes et allergiques.

Parmi les pathologies tumorales susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer le mélanome, notamment à l'aide des analogues peptidiques du peptide MART1 27-35 décrits ci-dessus.

Parmi les maladies d'origine virale susceptibles d'être prévenues ou traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer:

- le SIDA provoqué par le virus de l'immuno-déficience humaine HIV1 et HIV2, notamment à l'aide des analogues peptidiques des peptides NEF et GAG décrits ci-dessus,

- la paraplégie associée à HTVL-1, ou la leucémie à cellules T de l'adulte, provoquée par le virus de la leucémie humaine à cellules T (virus HTLV),

- infections provoquées par le virus respiratoire syncytial,

- infections provoquées par le virus coxsakie, par exemple méningites aiguës lymphocytaires,

- infections provoquées par le virus d'Epstein-Barr, par exemple la mononucléose infectieuse,

- infections provoquées par le cytomégalo virus, par exemple maladie des inclusions cytomégaliennes,

- herpès provoqué par le virus de l'herpès humain,

- herpès provoqué par le virus 6 de l'herpès simplex,

- infections provoquées par le parvovirus B19 humain, par exemple gastro-entérites infectieuses,

- l'hépatite B provoquée par le virus de l'hépatite B,

- l'hépatite C provoquée par le virus de l'hépatite C,

- la grippe provoquée par le virus influenza, notamment à l'aide des analogues peptidiques du peptide M58-66 décrits ci-dessus,

- la rubéole provoquée par le virus de la rubéole,

- infections provoquées par le virus de la Dengue, par exemple arboviroses,

- rhumes, rhinites, coryza provoqués par les rhinovirus

- la fièvre aphteuse provoquée par le virus de la fièvre aphteuse,

- le cancer du col de l'utérus provoqué par le papillomavirus (HPV).

Parmi les principales maladies auto-immunes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer celles rassemblées dans le Tableau A qui suit.

Tableau A

Principales maladies auto-immunes (en allant de haut en bas, des maladies auto-immunes spécifiques d'organes aux maladies auto-immunes non spécifiques d'organes).

5		
	Maladies	Autoantigènes impliqués
	Thyroïdite de Hashimoto	Thyroglobuline, microsomes
	Maladie de Basedow	Récepteur TSH
10	Maladie d'Addison	Corticosurrénale
	Insuffisance hypophysaire	Hypophyse
	Gastrite de Biermer	Cellule pariétale de l'estomac
		Facteur intrinsèque
15	Certaines stérilités	Spermatozoïdes, ovaires
	Diabète juvénile de type 1	Ilots Langerhans, insuline
	Syndrome de Goodpasture	Membrane basale glomérulaire
	Myasthénie	Muscle strié, récepteur acétyl-choline
20	Rhumatisme articulaire aigu	Myocarde (streptocoques)
	Pemphigus	Ponts intercellulaires épiderme
	Pemphigoïde bulleuse	Membrane basale cutanée
	Dermatite herpétiforme	Gliadine, réticuline
25	Vitiligo	Mélanocytes
	Pelade	Follicule pileux
	Psoriasis	
	Ophtalmie sympathique	Uvée
	Uvéite	Chambre antérieure de l'oeil
30	Syndrome de Guillain-Baré	
	Sclérose en plaques	Myéline
	Anémie hémolytique	Hématies
	Purpura thrombopénique idiopathique	Plaquettes
35	Leucopénie idiopathique	Granulocytes
	Cirrhose biliaire primitive	Mitochondries
	Hépatite chronique active	Muscle lisse, noyaux
	Rectocolite hémorragique	
	Iléite de Crohn	Côlon (<i>E. coli</i>)

Syndrome de Gougerot-Sjögren	Noyaux: SS-A, SS-B
Polyarthrite rhumatoïde	IgG, noyaux
Dermatopolymyosite	Noyaux: Jo1, muscles
Sclérodermie	Noyaux: Scl-70
5 Connectivite mixte	Noyaux: RNP
Lupus érythémateux discoïde	Noyaux:
Lupus érythémateux disséminé	Noyaux: ADN, antigène Sm
	Facteurs de coagulation
	Cardiolipine, etc...

10 L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, au moins un analogue peptidique (agoniste, le cas échéant partiel, ou antagoniste) tel que défini ci-

15 dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Avantageusement, les compositions pharmaceutiques selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, ou parentérale, notamment à raison d'environ 500 μ g à 5 mg par prise, notamment à raison de 3 prises par jour.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques telles que décrites ci-dessus, contenant à titre de principe actif au moins un antagoniste selon l'invention, et leur utilisation dans le cadre du traitement des maladies auto-immunes.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet encore, les compositions pharmaceutiques telles que décrites ci-dessus, contenant à titre de principe actif au moins un agoniste partiel selon l'invention, et leur utilisation dans le cadre du traitement des maladies allergiques.

30 L'invention a également pour objet tout vaccin, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de principe actif, au moins un analogue peptidique, de préférence agoniste, le cas échéant partiel, tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Avantageusement, les vaccins selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, ou parentérale, notamment à raison d'environ 500 μ g à 5 mg par prise, notamment à raison de 3 prises par jour.

35 L'invention a également pour objet toute composition destinée au diagnostic *in vivo* de pathologies susmentionnées impliquant la réponse immunitaire à médiation cellulaire, notamment les lymphocytes T cytotoxiques, ou à l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre desdites pathologies, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de

ladite composition de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un analogue peptidique, de préférence agoniste, le cas échéant partiel, tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule biologiquement acceptable.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus pour la préparation desdites compositions destinées au diagnostic *in vivo* des pathologies susmentionnées.

L'invention concerne également les complexes entre un analogue peptidique tel que défini ci-dessus, et une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (encore désigné complexes binaires CMH-analogue peptidique).

10 En effet, la réponse immunitaire met en jeu la reconnaissance d'un antigène endogène ou exogène par des cellules spécialisées. Pour être reconnu, l'antigène doit être initialement présenté de façon adéquate par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Alors que les lymphocytes B reconnaissent des épitopes portés par les antigènes intacts non modifiés, la présentation de l'antigène aux
15 lymphocytes T est plus complexe dans la mesure où l'antigène est d'abord internalisé par la cellule présentatrice, protéolysé, puis éventuellement réexprimé à sa surface sous forme de fragments peptidiques en association avec les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le lymphocyte T qui ne reconnaît pas l'antigène natif, reconnaît un fragment peptidique associé à une
20 molécule CMH.

Ces molécules CMH appartiennent essentiellement à deux classes: I et II.

Les molécules de classe I sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'une chaîne lourde α polymorphe associée de façon non covalente à une chaîne légère non glycosylée β_2m . Leur structure cristallographique a été
25 résolue (Bjorkman et al. (1987), Nature, 329: 506-512), et montre la présence d'un sillon formant le site de présentation du peptide dont le fond est composé de huit feuillet β et les bords de deux hélices α . Ces molécules sont présentées à la surface de la quasi totalité des cellules.

Les molécules de classe II sont également des glycoprotéines membranaires constituées de deux chaînes polymorphes α et β liées de façon non covalentes pour
30 former, comme le montre la structure cristallographique récemment élucidée (Brown et al. (1993), Nature, 364: 33-39), une plateforme β plissée supportant deux hélices α . Le sillon formé est le site de présentation du peptide. Ces molécules ne sont exprimées qu'à la surface de certaines cellules parmi lesquelles
35 les macrophages et les cellules B.

Les lymphocytes T cytotoxiques (cellules possédant des marqueurs CD8) reconnaissent des fragments protéolytiques de protéines virales associées aux molécules CMH de classe I et provoquent la lyse des cellules présentant l'antigène.

Les lymphocytes T auxiliaires (cellules portant des marqueurs CD4) reconnaissent des fragments de protéines exogènes capturées par endocytose présentés en association avec les molécules CMH de classe II et induisent la stimulation cellulaire de la réponse immunitaire.

5 L'invention a également pour objet les complexes entre un analogue peptidique selon l'invention, et un récepteur de cellules T (encore désignés complexes récepteur T-analogue peptidique).

L'invention vise également les complexes entre une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité, un analogue peptidique tel que défini ci-dessus, et un
10 récepteur de cellules T (encore désigné complexe ternaire CMH-analogue peptidique-récepteur T).

L'invention a également pour objet l'utilisation d'analogues peptidiques tels que définis ci-dessus, pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies mentionnées ci-dessus.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet, toute méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation cellulaire, notamment les lymphocytes T cytotoxiques, à savoir de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, de peptides exogènes ou endogènes pouvant interagir avec des molécules du CMH, et susceptibles d'être directement
20 ou indirectement impliqués dans le processus de développement de ces pathologies chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient, notamment du sang ou tout échantillon biologique susceptible de contenir des lymphocytes, avec un analogue peptidique tel que défini ci-dessus, dans des
25 conditions permettant la réaction entre les récepteurs des cellules T susceptibles d'être présentes dans l'échantillon biologique, et le susdit complexe binaire formé entre ledit analogue peptidique et les molécules de CMH présentes dans ledit échantillon;

- la détection *in vitro* du complexe ternaire CMH-analogue peptidique-récepteur T, susceptible d'être formé à l'étape précédente.

30

Les méthodes de diagnostic susmentionnées de l'invention sont avantageusement réalisées de la façon suivante:

- incubation dudit échantillon biologique avec des analogues peptidiques selon l'invention, lesdits analogues peptidiques étant fixés sur un support solide, notamment à l'intérieur de puits de plaques de microtitration de type de celles
35 habituellement utilisées pour la mise en oeuvre de techniques de détection ou dosage bien connues sous le nom d'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay),

- rinçage du support solide,

- incubation des éléments restés fixés sur le support solide après l'étape de rinçage précédente avec un milieu contenant des anticorps, notamment des anticorps anti-complexe ternaire selon l'invention, marqués (notamment de manière radioactive, enzymatique ou fluorescente), ou susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué,

- rinçage du support solide,
- détection des anticorps marqués restés respectivement liés aux complexes ternaires lors de l'étape d'incubation précédente.

L'invention a également pour objet les nécessaires ou kits pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* telles que décrites ci-dessus, comprenant:

- un analogue peptidique tel défini ci-dessus ;
- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique ;

- des réactifs permettant de détecter le complexe ternaire selon l'invention, qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où l'analogue peptidique n'est pas marqué.

L'invention a également pour objet les anticorps dirigés contre les complexes binaires CMH-analogue peptidique tels que définis ci-dessus, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un des complexes susmentionnés, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces complexes binaires.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux susmentionnés sont obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un complexe CMH-analogue peptidique selon l'invention, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un complexe CMH-analogue peptidique selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un complexe CMH-analogue peptidique selon l'invention, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit complexe. Ces

lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (notamment murines) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis du complexe CMH-analogue peptidique de l'invention pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

Les anticorps selon l'invention, sont plus particulièrement caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles de former un complexe avec des complexes CMH-analogues peptidiques, et/ou avec les complexes CMH-peptides ou protéines parents correspondant auxdits analogues peptidiques.

Avantageusement, les anticorps anti-complexes CMH-analogues peptidiques de l'invention reconnaissent les complexes CMH-peptides ou protéines parents susmentionnés avec une affinité au moins égale à celle présentée par les anticorps anti-complexes CMH-peptides ou protéines parents vis à vis des complexes CMH-peptides ou protéines parents.

L'affinité dont il est question ci-dessus peut se mesurer par la constante d'affinité à l'équilibre K_a des complexes impliquant l'un des susdits anticorps avec l'un des susdits complexes.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, ainsi que leur utilisation dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées.

L'invention concerne également le procédé de criblage d'analogues peptidiques tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- incubation (notamment à une température de 37°C) pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

• addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

• détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide,

• évaluation de la durée de l'association entre ledit analogue peptidique et les molécules du CMH.

L'invention a également pour objet toute trousse ou kit pour la mise en oeuvre d'un procédé de criblage d'analogues peptidiques tel que défini ci-dessus, comprenant :

- des molécules du CMH, et/ou
- des anticorps, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique, avantageusement fixés sur un support solide, ou fournis avec les réactifs nécessaires à leur fixation sur le support solide, et/ou
- des anticorps marqués, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I, et/ou
- un protocole pour la mise en oeuvre dudit procédé, et/ou
- un peptide de contrôle.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide des exemples qui suivent d'obtention et d'étude des propriétés d'analogues peptidiques tels que décrits ci-dessus.

I- Synthèse des analogues peptidiques de l'invention :

A) Généralités :

A titre d'illustration, la méthode de synthèse en phase liquide consiste à condenser successivement deux à deux les aminoacyles dans l'ordre requis ou à condenser des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments

préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides.

On pourra par exemple utiliser des groupements protecteurs de type uréthane (Boc, Fmoc benzyloxycarbonyl ou allyloxycarbonyl) pour protéger les extrémités N-terminales des acides aminés et des groupements de type ester (méthylique, éthylique, benzylique, tertio-butylique, allylique ou encore benzhydrylgllycolamidique) pour protéger les extrémités C-terminales des acides aminés.

Une telle synthèse peut être effectuée en condensant tout d'abord le résidu aminoacyle AA1 dont la fonction COOH est protégée avec le résidu aminoacyle AA2 dont la fonction NH₂ est protégée. La fonction amine du résidu AA2 dans le fragment AA2-AA1 ainsi obtenu, est alors déprotégée, pour condenser par la suite ledit fragment avec le résidu aminoacyle AA3 dont la fonction amine est protégée. Les étapes précédentes sont répétées autant de fois qu'il y a de résidus aminoacyles à introduire dans la chaîne des rétro analogues à synthétiser.

Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par R.D. Merrifield dans l'article intitulé "Solid phase peptide synthesis" (J. Am. Chem. Soc. (1963), 85, 2149-2154).

Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de Merrifield, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal (en l'occurrence AA1-OH) de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur la résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa fonction amine est protégée, par exemple par le groupe t-butyloxycarbonyle.

Lorsque le premier acide aminé C-terminal est ainsi fixé sur la résine, on enlève le groupe protecteur de la fonction amine en lavant la résine avec un acide.

On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est rattachée à la résine.

Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes protecteurs des différents acides aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine par exemple à l'aide d'acide fluorhydrique.

B) Cas particulier des analogues peptidiques de l'invention :

Une ou plusieurs des étapes de synthèse décrites ci-dessus peuvent être interrompues afin d'insérer une liaison différente de la liaison -CO-NH- entre

certains résidus aminoacyles, et/ou un ou plusieurs acides aminés non protéinogéniques.

B.1.) Synthèse d'analogues peptidiques comportant des liaisons peptidiques modifiées :

La notation Ψ (Spatola & Darlak, 1988) est généralement d'usage pour désigner le lien pseudopeptidique remplaçant la liaison amide (CONH). Parmi les modifications les plus fréquemment rencontrées, on peut citer par exemple les suivantes dont les synthèses sont détaillées dans les références bibliographiques indiquées : la liaison méthylèneamino (réduite) $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ (Szelke *et al.*, 1982 ; Martinez *et al.*, 1985 ; Sasaki & Coy, 1987) ; rétro-inverso $\Psi[\text{NHCO}]$ (Shemyakin *et al.*, 1969 ; Goodman & Chorev, 1979 ; Chorev & Goodman, 1993) ; oléfine $\Psi[\text{CH}=\text{CH}]$ (Hann *et al.*, 1982 ; Kempf *et al.*, 1991 ; Bohnstedt *et al.*, 1993) ; carba $\Psi[\text{CH}_2\text{CH}_2]$ (Rodriguez *et al.*, 1990a, 1990b) ; méthylèneoxy (éther) $\Psi[\text{CH}_2\text{O}]$ (TenBrink, 1986 ; Breton *et al.*, 1990) ; cétométhylène $\Psi[\text{COCH}_2]$ (Harbeson & Rich, 1989 ; Gonzalez-Muniz *et al.*, 1995), hydroxy éthylène $\Psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2]$ (Evans *et al.*, 1985 ; Wuts *et al.*, 1992).

1) Synthèse des pseudopeptides réduits correspondant aux séquences de MART et du peptide matrice M58-66 :

La contribution de la fonction amine de chaque liaison peptidique de l'antigène Mart-1 27-35 (AAGIGILTV) de la protéine Mart-1 du mélanome et de l'antigène M58-66 (GLLG FVFTL) de la protéine matrice du virus de la grippe a été évaluée au niveau des interactions de ces antigènes avec leurs récepteurs: la molécule de classe I du MHC HLA-A2 et le TCR.

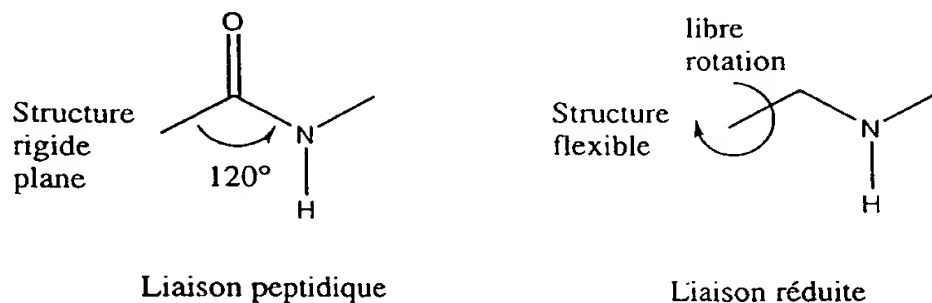


Schéma 1: Représentation schématique des liaisons peptidique et réduite.

La liaison réduite ou méthylène amino a la particularité d'être plus flexible que la liaison peptidique en raison d'une libre rotation de la liaison carbone-carbone (schéma 1). L'introduction d'une liaison réduite peut modifier localement l'orientation des chaînes latérales des acides aminés. La liaison réduite peut exister sous sa forme protonée à pH physiologique. Les modifications entraînées par la présence d'une liaison réduite, à savoir la modification de la structure et la modification du caractère hydrophile du peptide parent, peuvent avoir des implications dans les phénomènes de fixation et de reconnaissance de l'antigène.

La synthèse de chaque peptide réduit a été réalisée en phase solide et en chimie Fmoc classique. La liaison réduite est obtenue par condensation d'un α -amino aldéhyde N-protégé avec l'acide α -aminé immobilisé sur la résine. L'imine formée est réduite *in situ* par le cyanoborohydrure de sodium pour conduire à la liaison réduite selon la méthode décrite par Sasaki et Coy en 1987 (schéma 2).

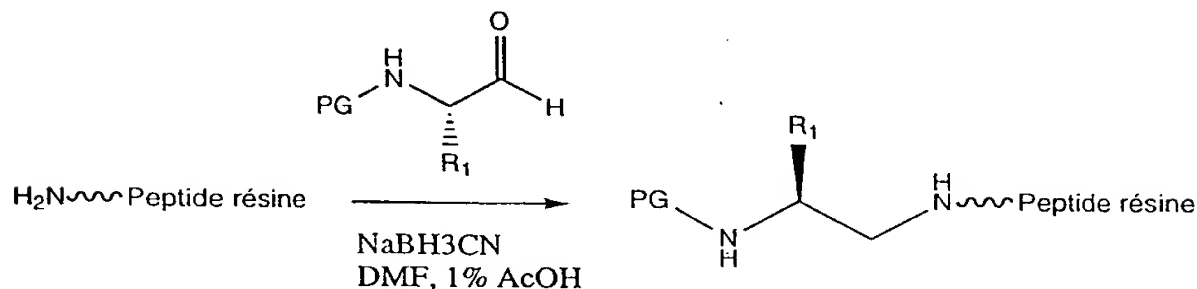


Schéma 2: Incorporation en phase solide de la liaison réduite. PG: groupement protecteur Fmoc.

L' α -amino aldéhyde est synthétisé par la méthode de Fehrentz et Castro, 1983. Cette méthode permet l'obtention rapide, sans racémisation, de l' α -amino aldéhyde N-protégé à partir du N,O-diméthylhydroxamate de l'acide aminé N-protégé correspondant (schéma 3).

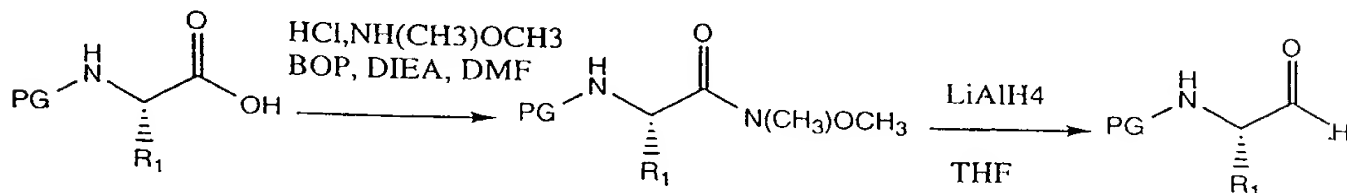


Schéma 3: Synthèse des α -amino aldéhydes N-protégés par la méthode de Fehrentz et Castro. PG: groupement protecteur Fmoc.

Les acides aminés suivants de la séquence du peptide réduit sont couplés d'une manière classique. Après synthèse, le peptide réduit est déprotégé et décroché de la résine par l'acide trifluoroacétique (TFA). Chaque peptide réduit est purifié par chromatographie liquide haute pression à polarité de phases inversée (RP-HPLC). La masse de chaque peptide est contrôlée par désorption laser assistée d'une matrice (MALDI) à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF.

Les temps de rétention (Tr) sur colonne RP-HPLC C18 dans un gradient de 5 à 65 % de B en 30 mn (avec A = eau à 0,1 % de TFA et B = acétonitrile (ACN) à 0,08 % de TFA) ainsi que les masses des différents peptides sont reportés dans les tables 1 et 2.

Table 1: Séquences et caractéristiques des peptides réduits analogues de Mart-1 27-35

15	Séquences									Tr	masse		
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9				
	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.74	814.4
	Ψ(1-2)	H-AΨ(CH ₂ NH)A	-G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.53	802.7	
20	Ψ(2-3)	H- A	- AΨ(CH ₂ NH)G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.58	802.9	
	Ψ(3-4)	H- A	- A	-GΨ(CH ₂ NH)I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	11.85	801.6	
	Ψ(4-5)	H- A	- A	- G	- IΨ(CH ₂ NH)G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.03	801.5	
	Ψ(5-6)	H- A	- A	- G	- I	- GΨ(CH ₂ NH)I	- L	- T	- V	-OH	11.29	801.4	
	Ψ(6-7)	H- A	- A	- G	- I	- G	- IΨ(CH ₂ NH)L	- T	- V	-OH	12.00	800.4	
25	Ψ(7-8)	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- LΨ(CH ₂ NH)T	- V	-OH	12.77	801.5	
	Ψ(8-9)	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- TΨ(CH ₂ NH)V	-OH	12.46	801.3	

Table 2: Séquences et caractéristiques des peptides réduits analogues de M58-66

30	Séquences									Tr	masse	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9			
M58-66	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	- T	- L	-OH	12.35*	968.0
Ψ(1-2)	H-GΨ(CH ₂ NH)L	-L	- G	- F	- V	- F	- T	- L	-OH	10.67*	956.2	
35 Ψ(2-3)	H- G	- LΨ(CH ₂ NH)L	- G	- F	- V	- F	- T	- L	-OH	11.18*	957.1	
Ψ(3-4)	H- G	- L	-LΨ(CH ₂ NH)G	- F	- V	- F	- T	- L	-OH	16.01	957.3	
Ψ(4-5)	H- G	- L	- L	- GΨ(CH ₂ NH)F	- V	- F	- T	- L	-OH	15.61	954.3	
Ψ(5-6)	H- G	- L	- L	- G	- FΨ(CH ₂ NH)V	- F	- T	- L	-OH	10.80*	955.8	
Ψ(6-7)	H- G	- L	- L	- G	- F	- VΨ(CH ₂ NH)F	- T	- L	-OH	11.85*	953.2	
40 Ψ(7-8)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- FΨ(CH ₂ NH)T	- L	-OH	13.05*	954.7	
Ψ(8-9)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	- TΨ(CH ₂ NH)L	-OH	11.21*	957.3	

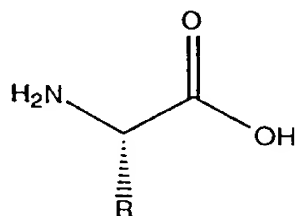
Temps de rétention dans le gradient 20 à 80 % de B en 30 mn (avec A = eau à 0,1 % de TFA et B = ACN à 0,08 % de TFA).

2) Synthèse des analogues β du peptide MART parent et du peptide MART muté (Leu²⁸) :

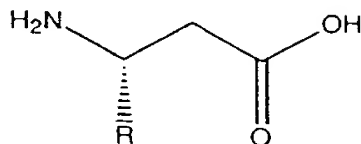
Les analogues β sont obtenus par couplage de β -homo acides aminés à la place des acides aminés naturels.

5

10



Acide aminé

 β -homo acide aminé

15

Schéma 4: Représentation schématique d'un acide aminé et d'un β -homo acide aminé

20

25

Le β -homo acide aminé est un acide aminé dans lequel un groupe méthylène a été inséré entre le carbone α et le carboxyle. La configuration du C_α est inchangée (schéma 4). L'incorporation d'un β -homo acide aminé à la place d'un acide aminé dans une séquence peptidique a pour conséquence d'allonger la chaîne peptidique des analogues peptidiques résultants. Ces analogues peptidiques plus longs peuvent être amenés à se tordre, à s'arc-bouter pour pénétrer dans la poche de liaison de la molécule de classe I du CMH. Dans ce cas, certaines chaînes latérales peuvent être déplacées latéralement ou leur orientation modifiée, ce qui peut entraîner des interactions préférentielles avec la molécule de classe I du CMH et/ou le TCR.

30

Les β -homo acides aminés sont obtenus par synthèse chimique en plusieurs étapes à partir des acides aminés N-protégés correspondants d'après le schéma suivant (Schéma 5).

35

L'acide aminé protégé sur sa fonction amine par le groupement Boc est dans un premier temps activé par la méthode aux anhydrides mixtes. L'acide aminé activé réagit avec le diazométhane pour conduire à la diazométhylcétone 2. Le réarrangement de Wolff de cette diazométhylcétone dans le méthanol, en présence du benzoate d'argent et de triéthylamine donne le β -homo méthylester de l'acide aminé protégé par le groupement Boc. Une saponification conduit au composé 3. La déprotection du Boc, suivie de la reprotection de la fonction amine par le groupement Fmoc sont les dernières étapes pour l'obtention du β -homo acide aminé, protégé par le Fmoc.

Le composé 4 est introduit par les méthodes conventionnelles de couplage des acides aminés au cours de la synthèse en phase solide en stratégie Fmoc. En pratique, 5 équivalents du mélange (4/BOP/HOBt) sont couplés pendant 20 mn dans le DMF. Le groupement Fmoc est déprotégé par la pipéridine à 50% dans le DMF et la synthèse est poursuivie d'une manière classique. Pour le décrochage et la déprotection du peptide ainsi que la purification et la caractérisation des peptides, voir paragraphe précédent.

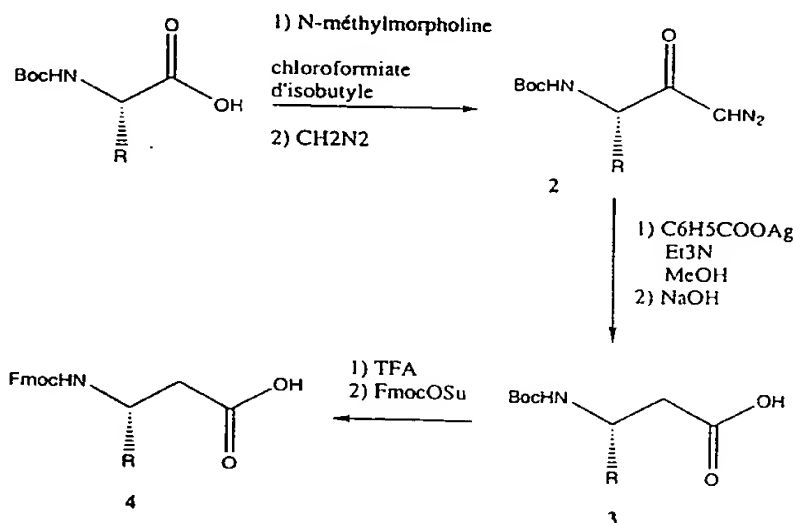


Schéma 5: Schéma de synthèse des Fmoc-β-homo acides aminés

Dans les tables 3 et 4 sont reportés les temps de rétention en RP-HPLC des peptides β sur une colonne C18 (gradient de 5 à 65% de B en 30 mn avec A = eau à 0,1% de TFA et B = ACN à 0,08% de TFA) ainsi que l'analyse de leur masse par MALDI.

Table 3: Séquences et caractéristiques des peptides β, analogues de Mart-1 27-35

		Séquences											
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Rt'	masse	
30													
	MARTI 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH	12.74	814.4
	β1	H-β-homoA	-A-	G-	I-	G-	I-	L-	T-	V	-OH	12.62	868.9*
	β2	H- A-β-homoA-	G-	I-	G-	I-	L-	T-	V	-OH	12.50	829.9	
	β3	H- A	- A-β-homoG-	I-	G-	I-	L-	T-	V	-OH	12.48	828.9	
35	β4	H- A	- A	- G-β-homoI-	G-	I-	L-	T-	V	-OH	12.50	829.5	
	β5	H- A	- A	- G-	I-β-homoG-	I-	L-	T-	V	-OH	12.50	828.9	
	β6	H- A	- A	- G-	I-	G-β-homoI-	L-	T-	V	-OH	12.64	829.0	
	β7	H- A	- A	- G-	I-	G-	I-β-homoL-	T-	V	-OH	12.10	828.9	
	β8	H- A	- A	- G-	I-	G-	I-	L-β-homoT-	V	-OH	11.92	829.1	
40	β9	H- A	- A	- G-	I-	G-	I-	L-	T-β-homoV-	OH	12.68	829.2	

* correspond à M+K⁺

Le synthon Fmoc-Ile Ψ (CH₂CH₂)Gly-OH (4 de la Figure 7) est nécessaire à la synthèse de l'analogue [Ile³⁰ Ψ (CH₂CH₂)Gly³¹] Mart-1 27-35. Ce synthon est obtenu par synthèse chimique en plusieurs étapes (schéma 7).

Le diméthylhydroxamate du Boc- β -homole-OH (1) (pour la synthèse des β -homo acides aminés, voir paragraphe précédent) est réduit par l'hydru

5 d'aluminium lithium à basse température (-25°C) dans le tétrahydrofurane afin d'obtenir l'aldéhyde correspondant (2). La réaction de Horner-Emmons en présence de triéthyl phosphonoacétate conduit au dipeptide éthylénique 3. L'hydrogénation de la double liaison, la saponification de l'ester, la déprotection

10 et la reprotection de la fonction amine par le groupe Fmoc permettent d'obtenir le Fmoc-Ile Ψ (CH₂CH₂)Gly-OH (4).

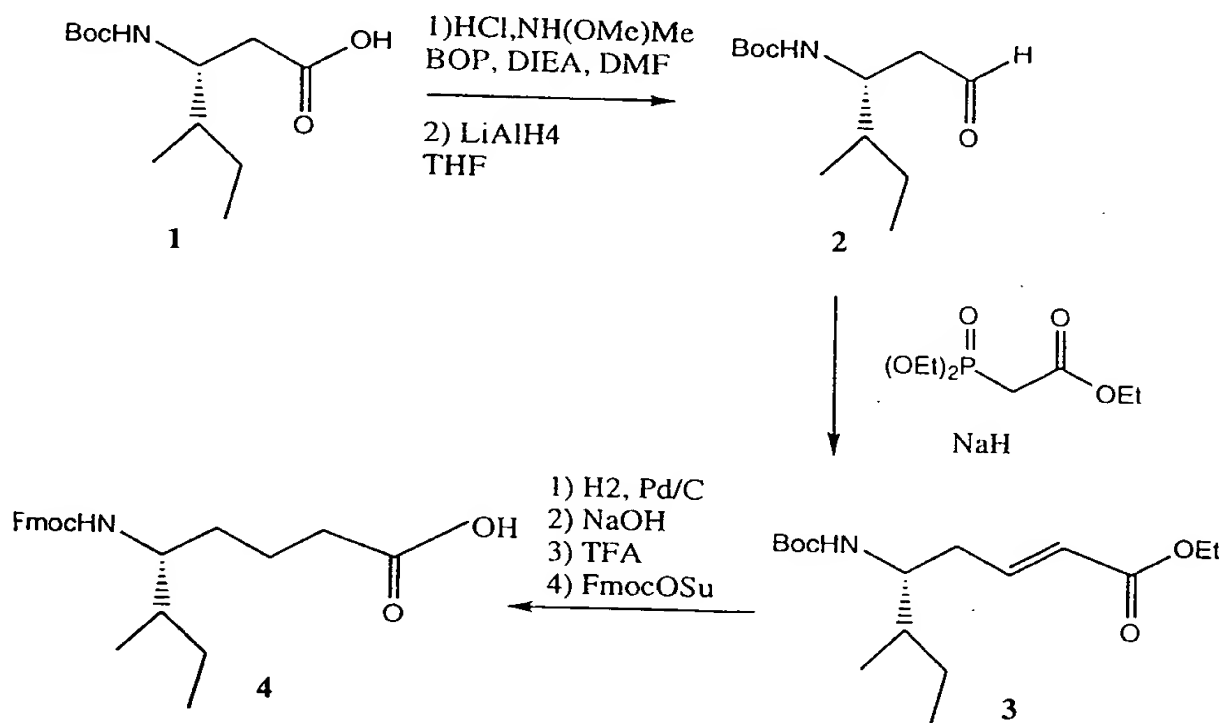


Schéma 7: Schéma de synthèse de Fmoc-Ile³⁰ Ψ (CH₂CH₂)Gly³¹-OH (4)

Ce synthon (4) est incorporé en phase solide en chimie Fmoc. Le couplage de 5 équivalents du mélange (synthon/BOP/HOBt) est réalisé 2 fois de suite (20 mn chaque) dans le DMF. Le groupement Fmoc est déprotégé par la pipéridine à 50% dans le DMF. Les acides aminés suivants sont couplés de

manière classique. Le peptide est déprotégé et décroché de la résine dans le TFA, précipité dans l'éther et purifié par RP-HPLC.

Le pseudopeptide [Ile³⁰Ψ(CH₂CH₂)Gly³¹] Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 100%. Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec A=eau à 0,1% de TFA et B=ACN à 0,08% de TFA) est de 13,49 mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue M+H⁺ 800,0.

4) Synthèse des pseudopeptides carba analogues 1 à 8 de MART1 27-35

La synthèse de ces peptides est effectuée selon la procédure décrite dans Rodriguez et al., Tetrahedron letters, 1990, 31, 7319-7322.

Le pseudopeptide 1 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 90%. Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 12,98/13,10 mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue M+H⁺ 799,1.

Le pseudopeptide 2 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 98%. Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 12,90 mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue M+H⁺ 799,16.

Le pseudopeptide 3 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 96% (3a), 95% (3b). Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 13,07 (3a), 13,54 (3b) mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue M+H⁺ 799,13.

Le pseudopeptide 4 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 100%. Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 13,49 mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue M+H⁺ 800,03.

Le pseudopeptide 5 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 99,7% (5a), 96% (5b). Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 12,72 (5a), 14,16 (5b) mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue M+H⁺ 799,1.

Le pseudopeptide 6 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 86% (6a), 90% (6b). Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 13,25 (6a), 13,72 (6b) mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue $M+H^+$ 799,16.

Le pseudopeptide 7 carba Mart-1 27 a un temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 10,20 (7a), 13,61 (7b) mn.

Le pseudopeptide 8 carba Mart-1 27-35 est obtenu avec une pureté de 99%. Son temps de rétention dans le gradient de 5 à 65% de B (avec comme éluant : A=eau à 0,1% de TFA et B=Acétonitrile (ACN) à 0,08% de TFA) est de 15,24/15,29 mn. L'analyse de la masse du pseudopeptide par MALDI à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF donne la masse attendue $M+H^+$ 798.

B.2.) Synthèse d'analogues peptidiques comportant des acides aminés non protéinogéniques :

Synthèse du peptide analogue [Tic62] M58-66

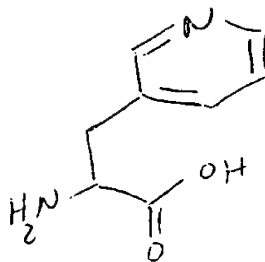
Le tétrahydroisoquinolène-3-carboxylique acide est un analogue contraint de la phénylalanine. Il a été introduit en position 62 dans la séquence du peptide matrice de la grippe à la place de la phénylalanine naturelle afin d'étudier l'importance de l'orientation du groupe phényle dans l'interaction avec la molécule CMH et le TCR.

La synthèse du peptide analogue a été réalisée en chimie Fmoc classique. Le dérivé Fmoc-L-Tic-OH (commercialisé par la société Neosystem) a été introduit dans la chaîne en croissance en utilisant un procédé classique de couplage (BOP/HOBt/Fmoc-L-Tic-OH) en excès de 5 durant 20 mn dans du DMF. La déprotection du groupement Fmoc a été réalisée en plusieurs étapes en 50% pipéridine dans du DMF (4 traitements de 30 mn chacun séparés de 3 lavages de la résine en DMF). L'assemblage des acides aminés suivants n'a pas posé de problèmes particuliers. Après déprotection classique en TFA et purification HPLC, le peptide a été obtenu à 90% de pureté. La masse mesurée à l'aide du spectromètre Bruker Protein TOF était la masse attendue $M+H^+$ 978.9.

La synthèse du peptide analogue [Tic64]M58-66 est effectuée de la même façon que précédemment en introduisant le tétrahydroisoquinolène-3-carboxylique acide en lieu et place de la phénylalanine en position 64.

Toujours selon le même protocole :

les analogues 3-Pya62 et 3-Pya64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule

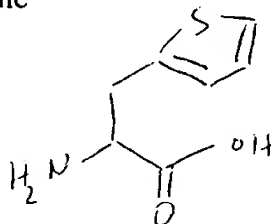


5

en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

les analogues 2-Tha62 et 2-Tha64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule

10



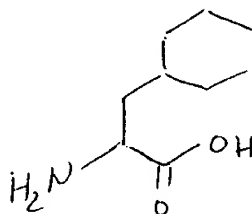
en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

15

les analogues D-Phe62 et D-Phe64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant la D-phénylalanine en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

les analogues Cha62 et Cha64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule

20

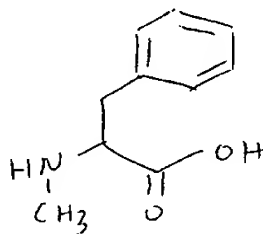


25

en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;

l'analogue N-MePhe62 de M58-66 a été obtenu en introduisant l'acide aminé de formule

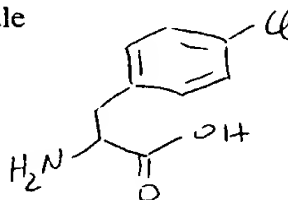
30



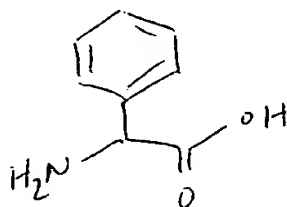
en lieu et place de la phénylalanine en position 62 ;

les analogues pCl-Phe62 et pCl-Phe64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant l'acide aminé de formule

35



en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement ;
les analogues Phg62 et Phg64 de M58-66 ont été obtenus en introduisant
l'acide aminé de formule



en lieu et place de la phénylalanine en positions 62 et 64 respectivement.

II- Etude des propriétés biologiques des analogues peptidiques synthétisés:

A) Méthodologie :

1) Détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité

1.1. Matériel

Sources de molécules d'histocompatibilité

Elles sont actuellement de deux types principaux: les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

- La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 (DeMars *et al.*, 1985; Ljunggren & Kärre, 1985 ; Salter & Cresswell, 1986) qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174. Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter des peptides exogènes.

- Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1,5 M et de la soude 12,5 mM (pH 11.7) pendant 1 h à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PD10, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0,05 % Tween 20, 2 mM EDTA, 0,1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic *et al.*, 1995).

Peptides

Les peptides testés sont utilisés à des concentrations variant de 100 μ M à 0,1 nM.

1.2. Protocole de l'assemblage

Des aliquots de 8×10^5 cellules T2 dans un volume de 64 μ l, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5, 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 μ M iodoacétamide, 2 μ g/ml aprotinine, 10 μ M leupeptine, 10 μ M pepstatine et 10 μ g/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 mn ou 1 h à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 rpm à 4°C, le surnageant est additionné de 140 μ l de PBS contenant 0,05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg/ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 h à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc, Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (Parham & Brodsky, 1981) (10 μ g/ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation des peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg/ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la β 2m. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-5521, Sigma) et est incubé à 2 μ g/ml pendant 1 h à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 mn à 20-25°C avec de l'extravidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat du 4-méthyl-umbelliferyl phosphate (M-8883, Sigma) à 100 μ M dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du $MgCl_2$ 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre 2300, Millipore.

1.3. Contrôle de la stabilité des complexes HLA/peptide

Le matériel utilisé est soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié il faut éliminer les peptides endogènes comme décrit dans le paragraphe I-1 et le mettre en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C pendant des temps variables de quelques mn à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque 96 puits (voir paragraphe I-2) avec l'anticorps anti-HLA (Parham & Brodsky, 1981) se fait pendant 1 h à 37°C. La révélation est classique (Teillaud *et al.*, 1982). Avec le lysat de la cellule T2, toutes les

incubations se font également à 37°C après avoir ajouté tous les inhibiteurs de protéases.

5 1.4. Analyse de la conformation des complexes HLA/peptide par la résonance plasmonique de surface par le BIAcore

Cet appareil mesure à l'aide d'un faisceau de lumière réfléchi les interactions moléculaires se produisant en temps réel dans un flux de tampon continu. Les anticorps anti-HLA sont dilués à 25 µg/ml dans du tampon acétate de Na pH 7.4 et fixés de façon covalente par leurs amines libres sur la matrice de dextran carboxyméthylée du "Sensor Chip CM5" activée avec 50 mM NHS et 200 mM EDC. L'injection se fait à 5 µl/mn pendant 6 mn puis les groupements réactifs résiduels sont bloqués avec 30 µl de chlorure d'éthanolamine pH 8.5. Les complexes HLA/peptide formés comme indiqué dans le paragraphe I-1 sont injectés (30 µl) à 2 µl/mn et vont pouvoir se lier à l'anticorps immobilisé. Les résultats sont exprimés en unités de résonance (RU) qui correspondent à l'angle de déviation du faisceau lumineux, déviation proportionnelle à la concentration de protéines au contact de la matrice. Le système peut être réutilisé après régénération en injectant 1 M éthanolamine pendant 2 mn. Des mesures cinétiques et d'affinité peuvent être réalisées.

20 2) **Induction de lymphocytes T cytolytiques *in vitro***

Les cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), non purifiées, sont cultivées en RPMI 1640 et 10% SAB avec des antibiotiques, à la concentration de 2×10^6 /ml à raison de 2 ml par puits (plaque Costar 24 puits). A ces cellules sont ajoutés la toxine tétanique (TT) à 1 µg/ml qui stimule les cellules T CD4+ et le peptide à tester en tant qu'inducteur de CTL à 1 µg/ml. Au jour 3 ou 4, de l'IL-7 est ajoutée à 50 U/ml. Pour chaque culture, 10 réplicats sont traités de manière indépendante. Les cellules effectrices générées sont restimulées par des PBMC préincubées avec le peptide (50 µg/ml pendant 4 h pour 10×10^6 cellules) puis irradiées à 6000 rads. Les cellules stimulatrices sont diluées à 10^6 /ml et 1 ml est ajouté par puits de culture après avoir enlevé 1 ml de surnageant. Le lendemain et 4 jours plus tard, de l'IL-2 (10 U/ml) et de l'IL-7 (50 U/ml) sont ajoutées. Les effecteurs sont restimulés tous les 7 à 10 jours de la même façon. Quand l'activité cytolytique est apparue l'IL-2 est ajoutée à 50 U/ml. La cytotoxicité peut être testée après 2 stimulations puis chaque semaine.

3) Analyse des fonctions effectrices

3.1. Test de cytolysé direct.

Les lignées T induites sont testées sur leur capacité à reconnaître le peptide inducteur présenté sur le HLA à la surface de cellules cibles, qui sont le plus fréquemment des cellules lymphoblastoïdes EBV. La cytolysé qui en résulte est déterminée par le test standard de 4 h de relargage de ^{51}Cr . Au Jour -3 ou -4 avant le test, l'ajout d'interleukines n'est pas fait car les cellules doivent être sevrées pour être en condition d'activation optimale. Pour les inductions primaires, la lyse ne peut être détectée avant 3 semaines. Les cellules cibles marquées pendant 1 h avec 10 μCi de ^{51}Cr sont préincubées avec le peptide (5 $\mu\text{g/ml}$ classiquement ou concentration variable). Après 2 lavages ces cellules sont réparties dans les puits d'une plaque de microtitration 96 puits à raison de 5000 par puits et les cellules effectrices sont ajoutées à des rapports variant de 1 à 100. Le relargage de ^{51}Cr (R) obtenu pendant l'incubation de 4 h à 37°C est mesuré. Le pourcentage de lyse est déterminé par la formule suivante:

$$(\text{R. expérimental} - \text{R. spontané} / \text{R. total} - \text{R. spontané}) \times 100$$

3.2. Analyse des interleukines

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les interleukines est faite avec une technique de RT-PCR semi-quantitative. Des PBMC ou des cellules purifiées CD8+ (1 à 2 x 10⁶) sont mises en culture dans des plaques 24 puits et stimulées avec soit des anticorps monoclonaux anti-CD3+ en présence de 100 nM de Phorbol Myristate Acetate (PMA) avec des PBMC autologues irradiés et sensibilisés ou non pendant 1 h 30 avec un peptide dont la reconnaissance est restreinte par les molécules du CMH. Pour les différentes interleukines, au bout de 12 à 14 h de stimulation (ou de 3, 10 et 24 h pour l'analyse cinétique de l'apparition des ARNm), les cellules sont récupérées et l'ARN total extrait par la technique au RNazol (Bioprobe, Montreuil, France). L'ARN (1 à 2 mg) est rétrotranscrit avec la superscript II (Gibco BRL). Les cDNA synthétisés sont dilués au 1/5 avec de l'eau et leur concentration quantifiée par PCR compétitive avec un plasmide (pQB.2) contenant la séquence de la B actine (produit de 237 pb gracieusement fourni par D. Shire). La réaction de PCR est faite en présence de 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.4 mM d'amorce sense et antisense, 2 U de Taq polymérase (Promega). L'amplification est réalisée en commençant par une dénaturation à 94°C, 5 mn, puis par 30 cycles à 94°C, 30 s, 55°C, 30 s, 72°C, 30 s, et une dernière élongation à 72°C, 10 mn, dans un thermostat régulé (Perkin Elmers 9600). L'analyse de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IFN-g est faite dans les

mêmes conditions que pour la B-actine, excepté le nombre de cycles qui varie entre 30 et 40. La quantification relative est réalisée par PCR compétitive.

B) Résultats :

1) Analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques :

1.1. Liaison sur la molécule A2 des peptides de la série M58-66 :

Les résultats sont représentés sur la figure 1 (figures 1A à 1C).

Les peptides ont été incubés à différentes concentrations à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de $\beta 2$ microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 adsorbé sur plaque et révélés par un second Ac anti $\beta 2$ microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. NP 383-391 est un peptide contrôle négatif. 0. peptide correspond au bruit de fond en absence de peptide. U.F. : unité arbitraire de fluorescence.

Seules deux modifications affectent la liaison de ces peptides modifiés sur la molécule HLA-A2 : modification par la D-Phényl en position 62 ([D-Phe62]M58-66) et en position 64 ([D-Phe64]M58-66).

1.2. Capacité de ces peptides à induire la lyse des cellules cibles T2 par une lignée de cellules T cytotoxiques (CTL) spécifique de M58-66 et restreinte par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 2 (figures 2A à 2D).

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de peptide. Après lavage, les cibles (5000 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec la lignée CTL à un rapport 10 cellules effectrices (E)/1 cellule cible (C). La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

Les modifications Phg-62 et 64, DPhe-62 et 64, Cha62 et 64, Tic 62 et 64 affectent la reconnaissance des lymphocytes T cytolytiques spécifiques du peptide M58-66.

1.3. Dose réponse.

Les résultats sont représentés sur la figure 3 (figures 3A et 3B).

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 1 h avec différentes concentrations de peptide. Après lavage, les cibles (5000 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec la lignée CTL à un rapport 10E/1C. La

lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

Les lymphocytes T cytolytiques spécifiques du peptide M58-66 ont une affinité plus faible pour les peptides modifiés.

2) Analogues peptidiques de Mart-1 comportant une liaison du type β -homologation :

2.1. Liaison sur la molécule A2.

Les résultats sont représentés sur la figure 4 (figures 4A et 4B).

Les différents peptides sont comparés pour leur capacité à se lier à la molécule HLA-A2.1 purifiée.

Les peptides ont été incubés à différentes concentrations à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de $\beta 2$ microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 adsorbé sur plaque et révélés par un second Ac anti $\beta 2$ microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. (U.F. : unité arbitraire de fluorescence).

NP est un peptide de la nucléoprotéine du virus de l'influenza qui ne se lie pas à la molécule HLA-A2 (contrôle négatif).

A part le peptide $\beta 4$ homo qui se lie mieux que le peptide parent, les autres peptides β homo ont une affinité intermédiaire à faible par rapport au peptide Mart-1.

2.2. Capacité de ces peptides à induire la lyse des cellules cibles T2 par 3 clones T spécifiques de Mart-1 restreints par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 5.

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec les différents clones T (LT8, LT11, LT12) à un rapport 3 cellules effectrices/1 cellule cible (E/T). La lyse spécifique est exprimée en % de lyse.

Les cellules cibles T2 incubées avec le peptide parent Mart-1 sont lysées à 90% par les trois clones cytolytiques (LT8, LT11 et LT12) spécifiques de ce peptide. En absence de peptide (0), aucune lyse n'est détectée. Seul le peptide $\beta 4$ homo est capable d'induire une activité de lyse similaire au peptide parent pour un seul clone (LT12).

2.3. Dose réponse.

Les résultats sont représentés sur la figure 6.

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec différentes concentrations de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec le clone T LT12 à un rapport 3E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

Le clone T LT12 a une affinité plus faible pour le peptide $\beta 4$ que vis-à-vis du peptide Mart-1.

3) Analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison -CH₂-NH-.

3.1. Liaison sur la molécule A2 des peptides de la série Mart-1 réduit.

Les résultats sont représentés sur la figure 7 (figures 7A et 7B).

Complexes formés peptides/HLA-A2 en fonction de la concentration en peptide :

Les peptides ont été incubés à deux concentrations différentes (10^{-4} M et 10^{-6} M) à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de $\beta 2$ microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 (spécifique de cette molécule de classe I et adsorbé au fond des puits) et révélés par un second Ac anti $\beta 2$ microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. (U.F. : unité arbitraire de fluorescence).

Les peptides ψ 1-2 à 4-5 ont une affinité intermédiaire à faible par rapport au peptide Mart-1. Les peptides ψ 4-5 à 8-9 se lient très faiblement à la molécule A2.1 purifiée.

3.2. Capacité des peptides de la série Mart réduit à induire la lyse des cellules cibles T2 par 3 clones T spécifiques de Mart restreints par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 8.

Test de lyse :

Des cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec 1 μ g/ml de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec les différents clones T (LT8, LT11, LT12) à un rapport 3 cellules effectrices/1 cellule cible (E/T). La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction des différents clones testés.

Les cellules cibles T2 incubées avec le peptide parent Mart-1 sont lysées à 90% par les trois clones cytolytiques (LT8, LT11 et LT12) spécifiques de ce peptide. En absence de peptide (0), aucune lyse n'est détectée. Seuls les peptides ψ 2-3, ψ 5-6 sont capables d'induire une activité de lyse similaire au peptide parent pour un seul clone (LT8 et LT12 respectivement). ψ 7-8 induit une activité de lyse plus faible détectée uniquement avec le clone LT12.

3.3. Dose réponse des différents peptides qui induisent une lyse avec les clones LT8 et LT12.

Les résultats sont représentés sur la figure 9 (figures 9A et 9B).

Test de lyse :

Des cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 2 h avec différentes concentrations de peptide. Après lavage, les cibles (1500 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec les différents clones T (LT8, LT12) à un rapport 3E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse en fonction de la concentration en peptide incubée avec les cibles.

Les peptides ψ 2-3 et ψ 5-6 ont une dose réponse comparable à celle du peptide parent alors que le peptide ψ 7-8 n'induit la lyse que faiblement même à concentration forte en peptide. Ce résultat suggère que la modification introduite diminue l'affinité du TCR (récepteur T) du clone LT8 pour ce peptide.

4) **Analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant une liaison -CH₂-NH-.**

4.1. Liaison sur la molécule A2 des peptides de la série M58-66 réduit.

Les résultats sont représentés sur la figure 10 (figures 10A et 10B).

Les peptides ont été incubés à différentes concentrations à 4°C 18 h en présence de molécules HLA-A2 dénaturées et de β 2 microglobuline. Les complexes stables HLA-A2/peptide formés à 4°C sont capturés à l'Ac BB7.2 adsorbé sur plaque et révélés par un second Ac anti β 2 microglobuline couplé à la phosphatase alcaline. La quantité de complexes formés HLA-A2/peptide est proportionnelle à l'intensité de fluorescence détectée au cytofluor. U.F. : unité arbitraire de fluorescence.

Les peptides Mart-1 modifiés par réduction ont une affinité intermédiaire pour la molécule HLA-A2. La réduction en position 2-3 et 8-9 rend la liaison indétectable pour le clone étudié.

4.2. Capacité des peptides de la série réduit M58-66 à induire la lyse des cellules cibles T2 par une lignée CTL induite par M58-66 et restreinte par la molécule HLA-A2.1.

Les résultats sont représentés sur la figure 11.

Les cellules cibles T2 A2 ont été chromées (Cr51), puis incubées pendant 1 h avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de peptide. Après lavage, les cibles (5000 par puits) ont été incubées pendant 4 h avec la lignée CTL à un rapport 10E/1C. La lyse spécifique est exprimée en % de lyse.

La réduction en position 2-3 et 5-6 n'affecte pas la reconnaissance du peptide par les lymphocytes T cytolytiques spécifiques du peptide M58-66.

LEGENDE DES FIGURES :

- Figure 1 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques : les concentrations des analogues peptidiques (10^{-4} à 10^{-10} M) sont indiquées en abscisse, les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 1A : étude de la liaison des analogues peptidiques [Tic62]M58-66 (encore désigné M58-66 Tic62 ou Tic62), [3-Pya62]M58-66 (3-Pya62), [2-Tha62]M58-66 (2-Tha62), [D-Phe62]M58-66 (D-Phe62), [Tic64]M58-66 (Tic64),

. Figure 1B : étude de la liaison des analogues peptidiques [3-Pya64]M58-66 (3-Pya64), [2-Tha64]M58-66 (2-Tha64), [D-Phe64]M58-66 (D-Phe64), [Cha62]M58-66 (Cha62), [N-MePhe62]M58-66 (N-MePhe62),

. Figure 1C : liaison des analogues peptidiques [pCl-Ph62]M58-66 (pCl-Phe62), [Phg62]M58-66 (Phg62), [Cha64]M58-66 (Cha64), [pCl-Phe64]M58-66 (pCl-Phe64), [Phg64]M58-66 (Phg64),

en comparaison avec le peptide M58-66, le peptide de contrôle négatif NP383-391, et une solution ne contenant aucun peptide (0 peptide).

- Figure 2 : étude de l'effet d'analogues peptidiques de M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques sur la lyse d'une lignée de cellules cibles T2 par une lignée de cellules T cytotoxiques spécifiques de M58-66 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée et le rapport E/T (cellules effectrices/cellules cibles) est représenté en abscisse :

. Figure 2A : effet des analogues Tic62 et Tic64 sur la lyse des cellules T2,

. Figure 2B : effet des analogues D-Phe62, D-Phe64, Cha62, Cha64 sur la lyse des cellules T2,

. Figure 2C : effet des analogues 3-Pya62, 3-Pya64, 2-Tha62, 2-Tha64 sur la lyse des cellules T2,

. Figure 2D : effet des analogues pCl-Phe64, Phg64, pCl-Phe62, Phg62 sur la lyse des cellules T2, en comparaison avec les effets du peptide M58-66, et d'une solution ne contenant pas de peptide (0 peptide).

5 - Figure 3 : étude de la réponse des cellules T cytotoxiques en fonction de la concentration d'analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant des acides aminés non protéinogéniques : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et la concentration des peptides en abscisse :

. Figure 3A : étude en fonction de la concentration de pCl-Phe62 et pCl-Phe64,

. Figure 3B : étude en fonction de la concentration de 2-Tha62 et de 2-Tha64,

en comparaison avec la concentration de M58-66.

15 - Figure 4 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison du type β -homologation ; les concentrations des analogues peptidiques (10^{-5} à 10^{-7} M) sont indiquées en abscisse, les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 4A : étude de la liaison des analogues β 1 homo (B1), β 2 homo (B2), β 3 homo (B3), β 4 homo (B4),

20 . Figure 4B : étude de la liaison des analogues β 5 homo (B5), β 6 homo (B6), β 7 homo (B7), β 8 homo (B8), β 9 homo (B9),

en comparaison avec le peptide Mart-1 (Mart), et un peptide de contrôle négatif (NP).

25 - Figure 5 : étude de l'effet d'analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison du type β -homologation sur la lyse des cellules cibles T2 par 3 clones de cellules T cytotoxiques (LT8, T11 et LT12) spécifiques de Mart-1: le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et les analogues peptidiques B1 à B9 sont indiqués en abscisse, en comparaison avec Mart-1 et une solution sans peptide (0).

30 - Figure 6 : étude de la réponse des cellules T cytotoxiques en fonction de la concentration de l'analogue β 4 homo de Mart-1, en comparaison avec Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et la concentration en peptide (μ g/ml) en abscisse.

35 - Figure 7 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des analogues peptidiques du peptide Mart-1 comportant une liaison -CH₂-NH- (analogues réduits) : les peptides aux concentrations de 10^{-6} M ou de 10^{-4} M sont indiqués en abscisse, et les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 7A : étude de la liaison des peptides Ψ (1-2)Mart-1 (représenté par 1-2), Ψ (2-3)Mart-1 (2-3), Ψ (3-4)Mart-1 (3-4), Ψ (4-5)Mart-1 (4-5),

. Figure 7B : étude de la liaison des peptides $\Psi(5-6)$ Mart-1 (5-6),
5 $\Psi(6-7)$ Mart-1 (6-7), $\Psi(7-8)$ Mart-1 (7-8), $\Psi(8-9)$ Mart-1 (8-9),
en comparaison avec Mart-1.

- Figure 8 : étude de l'effet des analogues réduits 1-2 à 8-9 de Mart-1 sur la
lyse de cellules T2 par 3 clones de cellules T (LT8, LT11 et LT12) spécifiques de
Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et les analogues
peptidiques 1-2 à 8-9 sont indiqués en abscisse, en comparaison avec Mart-1 et
une solution sans peptide (0).

- Figure 9 : étude de la réponse des cellules T cytotoxiques en fonction de la
10 concentration d'analogues réduits de Mart-1 : le pourcentage de lyse est indiqué en
ordonnée, et la concentration des peptides en abscisse ($\mu\text{g/ml}$) :

. Figure 9A : étude en fonction de la concentration des analogues 2-3 et 7-8,

. Figure 9B : étude en fonction de la concentration de l'analogue 5-6,
en comparaison avec la concentration de Mart-1.

15 - Figure 10 : étude de la liaison aux molécules du CMH (HLA-A2) des
analogues peptidiques du peptide M58-66 comportant une liaison $-\text{CH}_2\text{-NH-}$
(analogues réduits) : les concentrations des peptides (10^{-10} à 10^{-4} M) sont
indiquées en abscisse, et les unités de fluorescence sont indiquées en ordonnée :

. Figure 10A : étude de la liaison des peptides $\Psi(1-2)$ M58-66 (1-2),

20 $\Psi(2-3)$ M58-66 (2-3), $\Psi(3-4)$ M58-66 (3-4), $\Psi(4-5)$ M58-66 (4-5),

. Figure 10B : étude de la liaison des peptides $\Psi(5-6)$ M58-66 (5-6),

$\Psi(6-7)$ M58-66 (6-7), $\Psi(7-8)$ M58-66 (7-8), $\Psi(8-9)$ M58-66 (8-9),

en comparaison avec M58-66, et un peptide muté (GIL) de M58-66 portant la
mutation GLL \rightarrow GIL [M58-66 (GIL)],

25 - Figure 11 : étude de l'effet des analogues réduits 1-2 à 8-9 de M58-66 sur
la lyse de cellules T2 par un clone de cellules T spécifique de M58-66 : le
pourcentage de lyse est indiqué en ordonnée, et le rapport cellules
effectrices/cellules cibles (E/T) est indiqué en abscisse, en comparaison avec
M58-66, M58-66 muté (GIL) et une solution sans peptide (0).

30

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5
1. Bohnstedt A.C. *et al.* Tetrahedron Lett. 1993, 34:5217-5220.
2. Breton P. *et al.* Int. J. Peptide Protein Res. 1990, 35:346-351.
3. Chorev M. & Goodman M. Acc. Chem. Res. 1993, 26:266-273.
- 10
4. DeMars *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82:8183.
5. Evans B.E. *et al.* J. Org. Chem. 1985, 50:4615-4625.
6. Gnjatic S. *et al.* Eur. J. Immunol. 1995, 25:1638-1642.
- 15
7. Gonzalez-Muniz R. *et al.* J. Med. Chem. 1995, 38:1015-1021.
8. Goodman M. & Chorev M. Acc. Chem. Res. 1979, 12:1-7.
- 20
9. Harbeson S.L. & Rich D.H. J. Med. Chem. 1989, 32:1378-1392.
10. Hann M.M. *et al.* J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1982, 1:307-314.
11. Kempf D.J. *et al.* Int. J. Peptide Protein Res. 1991, 38:237-241.
- 25
12. Ljunggren H.G. & Kärre K. J. Exp. Med. 1985, 162:1745.
13. Martinez J. *et al.* J. Med. Chem. 1985, 28:1874.
- 30
14. Parham P. & Brodsky F.M. J. Immunol. 1981, 3:277.
15. Rodriguez M. *et al.* Tetrahedron Lett. 1990a, 31:5153-5156.
16. Rodriguez M. *et al.* Tetrahedron Lett. 1990b, 31:7319-7322.
- 35
17. Salter R.D. & Cresswell P. EMBO J. 1986, 5:943.
18. Sasaki Y. & Coy D.H. Peptides 1987, 8:119-121.

19. Shemyakin M.M. *et al.* Angew Chem. Internat. Edit. 1969, 8:492-499.

20. Szelke M. *et al.* Nature 1982, 299:555-557.

5 21. Teillaud *et al.* Immunogenetics 1982, 15:377.

22. TenBrink R.E. J. Org. Chem. 1987, 52:418-422.

23. Wuts P.G.M. *et al.* J. Org. Chem. 1992, 57:6696-6700.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'analogues peptidiques de peptides parents, ces peptides parents étant le cas échéant issus de protéines exogènes ou endogènes, lesdits
5 peptides parents interagissant avec des molécules du CMH dans le cadre de pathologies impliquant une réponse immunitaire à médiation cellulaire, chez l'homme ou l'animal, lesdits analogues étant caractérisés en ce qu'ils correspondent auxdits peptides parents dans lesquels :

- au moins une liaison peptidique $-CO-NH-$ de la chaîne peptidique, est
10 modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, ou

- au moins un acide aminé de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ou

- au moins une liaison peptidique $-CO-NH-$ de la chaîne peptidique, est modifiée, et au moins un acide aminé de ladite chaîne peptidique est substitué par
15 un acide aminé non protéinogénique,

pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des pathologies susmentionnées.

2. Utilisation selon la revendication 1, d'analogues peptidiques issus de
20 peptides parents interagissant avec des molécules du CMH de classe I, dans le cadre de pathologies impliquant les lymphocytes T cytotoxiques.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, d'analogues peptidiques caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques $-CO-NH-$ de la
25 chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison $-CO-NH-$, ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les suivantes :

$-CH_2-NH-$ (méthylène amino) ;

$-CH_2-CH_2-$ (carba) ;

30 $-CO-CH_2-$ (cétométhylène) ;

$-CH_2-O-$ (méthylène-oxy) ;

$-CHOH-CH_2-$ (hydroxyéthylène) ;

$-CHOH-CHOH-$ (di-hydroxyéthylène) ;

$-CH=CH-$ (E ou Z oléfine) ;

35 $-CHCN-NH-$ (cyanométhylène amino) ;

$-S-CH_2-$ (thiométhylène) ;

$-CH_2-S-$ (méthylène thio) ;

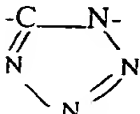
$-CS-NH-$ (thioamide) ;

$-PO_2-NH-$ (phosphonamide) ;

-CHOH- (hydroxyméthylène) ;

-NH-CO-NH- (urée) ;

-CH-CH- (oxirane) ;


5  (tétrazole) ;

-CH₂-CO-NH- (β-homologation) ;

-CHOH-CH₂-NH- (hydroxyéthylène amino) ;

10 -CO-NH-NH- (hydrazino).

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, d'analogues peptidiques caractérisés en ce que l'un au moins des acides aminés de la chaîne peptidique du peptide parent, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, ledit acide aminé non protéinogénique étant choisi notamment parmi les acides aminés suivants:

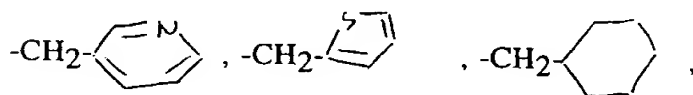
- les acides aminés de configuration D,
- les acides α-aminés de formule générale :

20

dans laquelle :

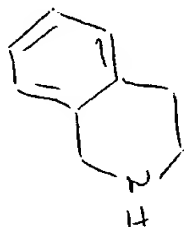
R₁, R₂ et R₃, représentent indépendamment les uns des autres : un atome d'hydrogène, un hydroxyle, un radical alkyle de 1 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un groupe allyle et ayant de 3 à 25 atomes de carbone, un radical contenant un ou plusieurs cycles aromatiques ou non, notamment un groupe aryle, et ayant de 6 à 25 atomes de carbone, et notamment les groupes suivants : -CH₃ (méthyl), -CH₂CH₃ (éthyl), -(CH₂)₄-CH₃, -CH(CH₃)₂ (isopropyl), -C(CH₃)₃ (tertiobutyl), -Φ (phényl), -CH₂Φ (benzyl), -CH₂ΦCl (para-chlorobenzyl), -CH₂-CH₂Φ (2-phényl-éthyl), -CH₂CHCH₂ (alkyl), méthylfluorényl, -CH₂CONH₂ (glycolamide), -CH₂CONΦ₂ (benzhydrylglycolamide), -CHOHΦ,

30

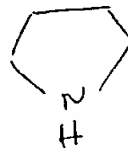


étant entendu que l'un des deux groupes R₂ et R₃ peuvent représenter une chaîne latérale d'acides aminés naturels lorsque soit R₁, soit l'autre des deux groupes R₂ et R₃ ne représentent pas un atome d'hydrogène,

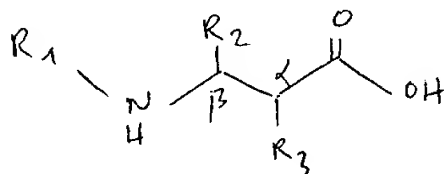
. le cas échéant, R_1 , R_2 , $C\alpha$ et N forment un hétérocycle de 4 à 8 atomes de carbone, aromatique ou non, le cas échéant substitué, notamment un hétérocycle de formule :



ou

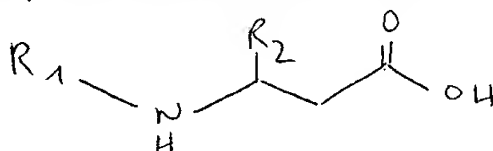


- les acides β -aminés de formule générale :



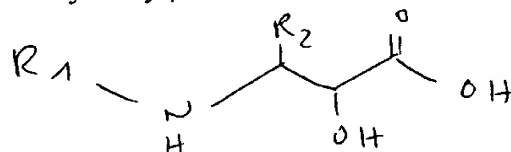
dans laquelle R_1 , R_2 et R_3 , indépendamment les uns des autres représentent une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou sont tels que définis ci-dessus, notamment :

. les β -homo amino acides de formule :



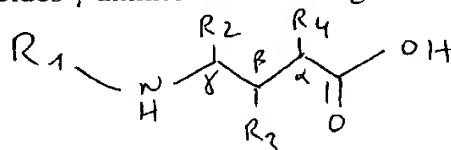
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus, ou

. les α -hydroxy β -homo amino acides de formule :



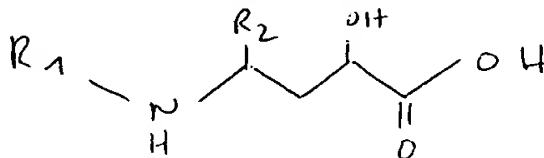
dans laquelle R_1 et R_2 , sont tels que définis ci-dessus,

- les acides γ -aminés de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent indépendamment les uns des autres une chaîne latérale d'un acide aminé naturel, ou R_1 , R_2 et R_3 , sont tels que définis ci-dessus, et R_4 a la même signification que celle donnée ci-dessus pour R_1 , R_2 et R_3 ,

notamment les dérivés de statine de formule :



5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, d'analogues peptidiques caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'une part d'être reconnus par les molécules du CMH et de s'associer avec ces dernières, notamment par mise en oeuvre de la méthode suivante :

- incubation, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

- addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

- détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet de reconnaissance et d'association entre les molécules du CMH et l'analogue peptidique étudié,

- et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en oeuvre d'une méthode de suivi dans le temps de la liaison établie entre l'analogue peptidique et les molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation de l'analogue peptidique en présence des molécules du CMH sur le

support solide recouvert dudit premier anticorps, se fait pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, d'analogues peptidiques caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés :

* parmi ceux susceptibles :

- d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- d'induire *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant :

. soit des agonistes des récepteurs (TCR) reconnaissant l'antigène (à savoir le peptide parent) des cellules T cytotoxiques, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes ou des antagonistes desdits récepteurs,

. soit des agonistes partiels desdits récepteurs, et dérivent de peptides parents se comportant eux-mêmes comme des agonistes desdits récepteurs, ces agonistes partiels induisant notamment la sécrétion d'une ou plusieurs cytokines différentes de celles dont la sécrétion est induite par les peptides parents,

* ou, parmi ceux :

- susceptibles d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques,

- n'induisant pas *in vitro* la cytolyse par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface l'analogue peptidique associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement

prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide parent de l'analogue peptidique étudié,

- n'induisant pas *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ ,

lesdits analogues peptidiques ainsi sélectionnés étant des antagonistes des récepteurs des cellules T cytotoxiques.

7. Analogues peptidiques de peptides parents impliqués dans le mélanome, notamment le peptide MART1 27-35, ledit peptide parent comportant, le cas échéant, une ou plusieurs mutations, tel que le peptide parent muté MART1 27-35 Leu²⁸, lesdits analogues peptidiques correspondant auxdits peptides parents dans lesquels l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, lesdits analogues étant notamment choisis parmi les suivants :

- les analogues peptidiques de MART1 27-35 dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-NH-, tels que les analogues $\Psi(1-2)$ à $\Psi(8-9)$ suivants :

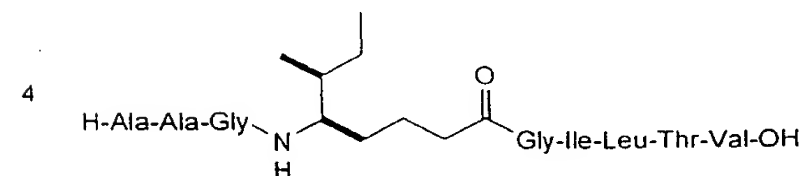
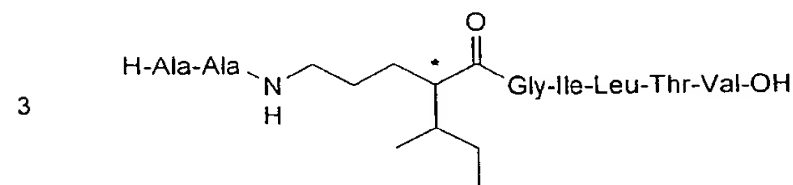
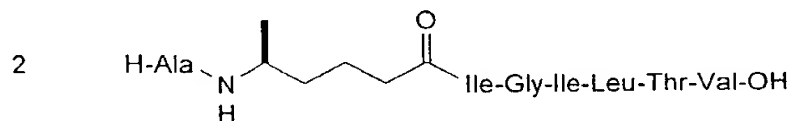
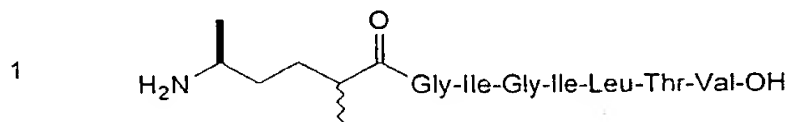
		Séquences								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
25	MART1 27-35	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V -OH
	$\Psi(1-2)$	H-A $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ A	- G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH
	$\Psi(2-3)$	H- A-	A- $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ G	- I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH
	$\Psi(3-4)$	H- A	- A	-G $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ I	- G	- I	- L	- T	- V	-OH
	$\Psi(4-5)$	H- A	- A	- G	-I $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ G	- I	- L	- T	- V	-OH
	$\Psi(5-6)$	H- A	- A	- G	- I	-G $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ I	- L	- T	- V	-OH
	$\Psi(6-7)$	H- A	- A	- G	- I	- G	-I $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ L	- T	- V	-OH
	$\Psi(7-8)$	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ T	- V	-OH
	$\Psi(8-9)$	H- A	- A	- G	- I	- G	- I	- L	- T $\Psi(\text{CH}_2\text{NH})$ V	-OH

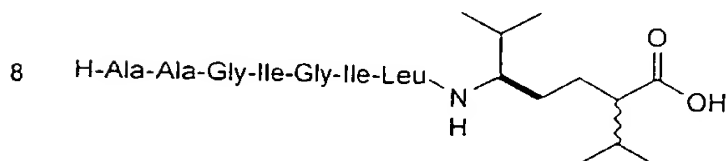
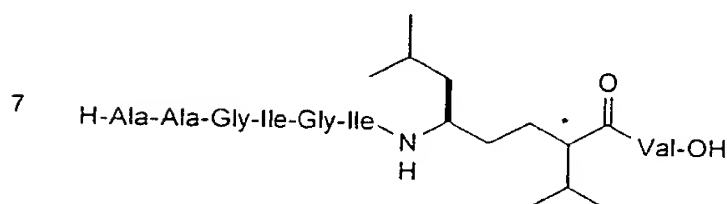
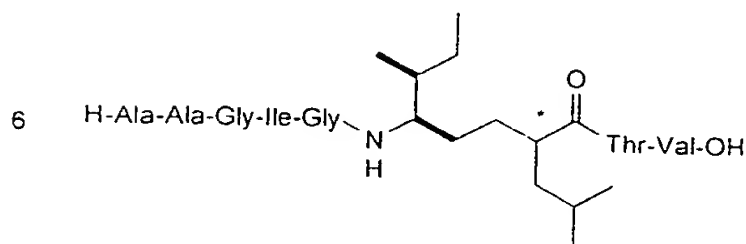
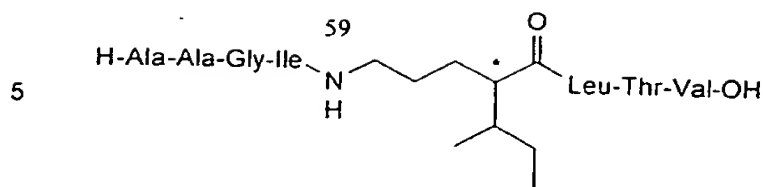
- les analogues peptidiques de MART1 27-35 dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-CO-NH-, encore désignée ci-après β -homo, tels que les analogues $\beta 1$ à $\beta 9$ suivants :

		Séquences																		
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9										
5	MART1 27-35	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH
	β1	H-	β-homoA	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH
	β2	H-	A	-	β-homoA	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH
	β3	H-	A	-	A	-	β-homoG	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH
	β4	H-	A	-	A	-	G	-	β-homoI	-	G	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH
	β5	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	β-homoG	-	I	-	L	-	T	-	V	-OH
	β6	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	β-homoI	-	L	-	T	-	V	-OH
	β7	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	β-homoL	-	T	-	V	-OH
	β8	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	β-homoT	-	V	-OH
	β9	H-	A	-	A	-	G	-	I	-	G	-	I	-	L	-	T	-	β-homoV	-OH
10																				

- les analogues peptidiques de MART1 27-35 Leu²⁸ dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-CO-NH-, tels que les analogues β1 à β9 susmentionnés dans lesquels l'alanine en P2 est remplacée par une leucine,

- les analogues peptidiques de MART1 27-35 dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-CH₂-, tels que les analogues suivants :



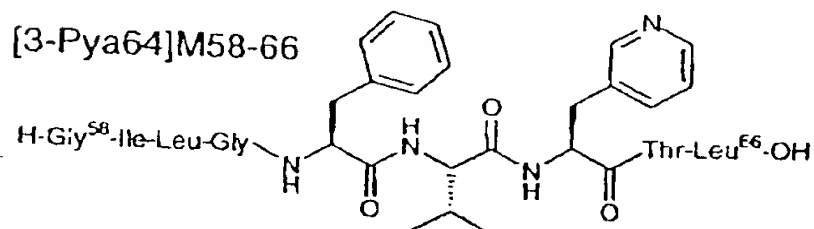
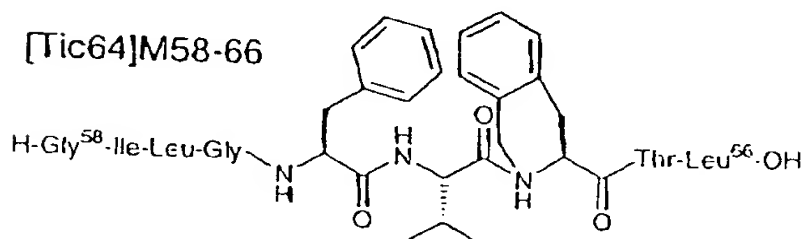
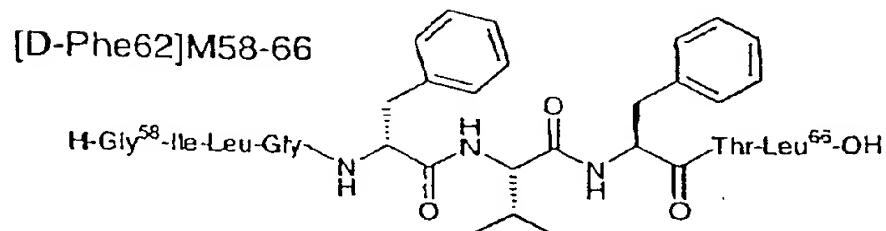
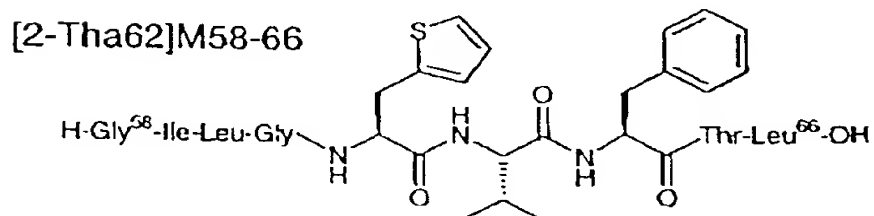
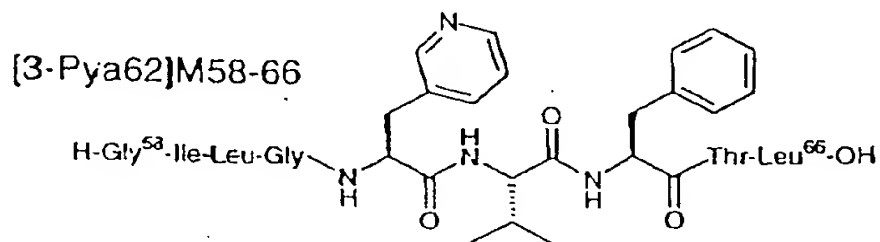
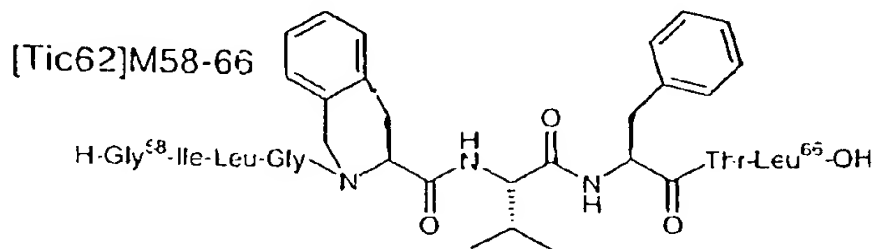


8. Analogues peptidiques des peptides parents du virus de la grippe, notamment du peptide parent M58-66, lesdits analogues peptidiques correspondant auxdits peptides parents dans lesquels:

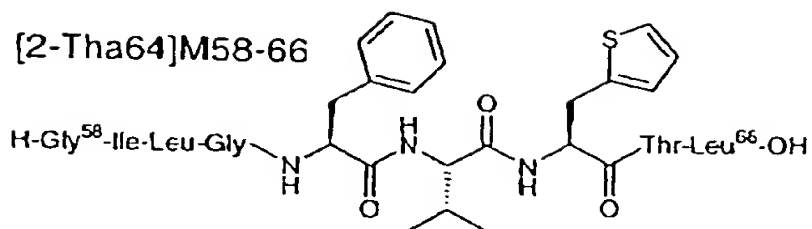
- l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, lesdits analogues étant notamment choisis parmi ceux dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-NH-, tels que les analogues suivants :

		Séquences								
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
30	M58-66	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(1-2)	H- G	Ψ(CH ₂ NH)	L- L	- G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(2-3)	H- G	- L	Ψ(CH ₂ NH)	L- G	- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(3-4)	H- G	- L	- L	Ψ(CH ₂ NH)	G- F	- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(4-5)	H- G	- L	- L	- G	Ψ(CH ₂ NH)	F- V	- F	- T	- L -OH
	Ψ(5-6)	H- G	- L	- L	- G	- F	Ψ(CH ₂ NH)	V- F	- T	- L -OH
35	Ψ(6-7)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	Ψ(CH ₂ NH)	F- T	- L -OH
	Ψ(7-8)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	Ψ(CH ₂ NH)	T - L -OH
	Ψ(8-9)	H- G	- L	- L	- G	- F	- V	- F	- T	Ψ(CH ₂ NH) L -OH

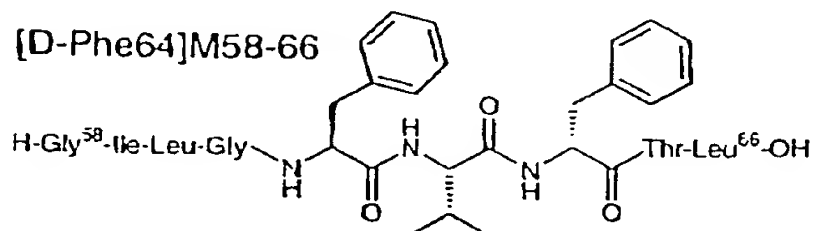
- l'un au moins des acides aminés de la chaîne peptidique, est substitué par un acide aminé non protéinogénique, tels que les analogues suivants :



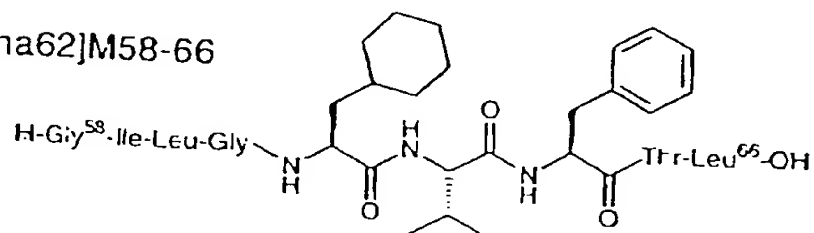
[2-Tha64]M58-66



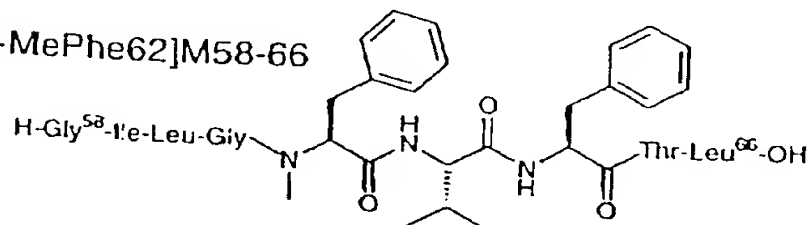
[D-Phe64]M58-66



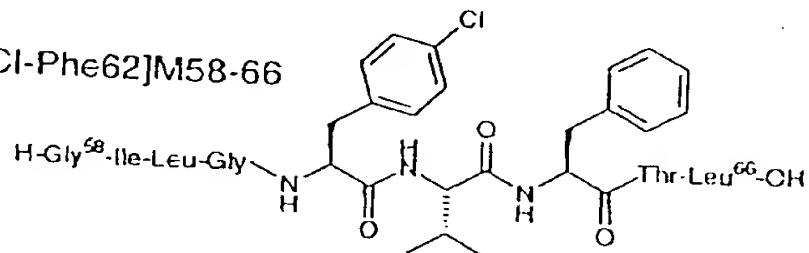
[Cha62]M58-66



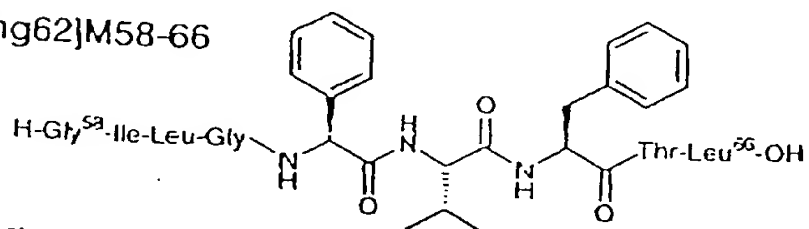
[N-MePhe62]M58-66

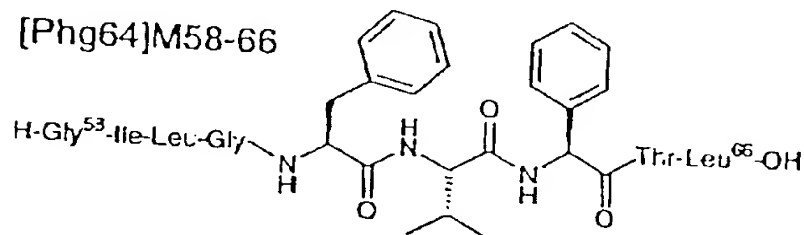
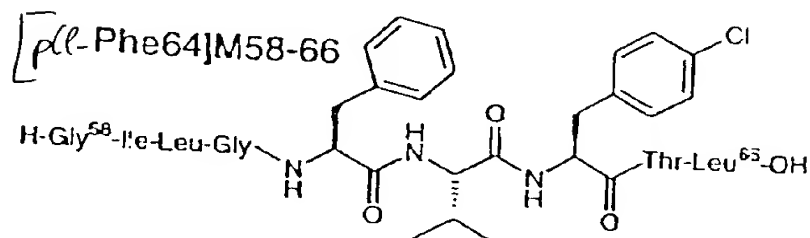
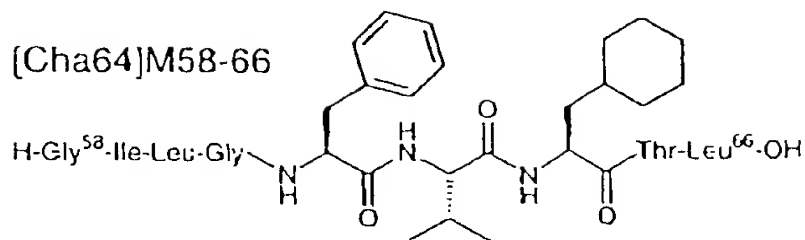


[pCl-Phe62]M58-66



[Phg62]M58-66





9. Analogues peptidiques de peptides parents du virus du SIDA, notamment des peptides NEF 84-92, et GAG 77-85, lesdits analogues peptidiques correspondant auxdits peptides parents dans lesquels l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- est modifiée, à l'exception des modifications du type rétro, ou rétro-inverso, lesdits analogues étant notamment choisis parmi :

- ceux dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CH₂-NH-, tels que les analogues NEFRD1-8 du peptide NEF, et GAGRD1-8 du peptide GAG suivants :

NEF	AVDLSHFLK
NEFRD1	AΨ(CH ₂ -NH)VDLSHFLK
NEFRD2	AVΨ(CH ₂ -NH)DLSHFLK
NEFRD3	AVDΨ(CH ₂ -NH)LSHFLK
NEFRD4	AVDLΨ(CH ₂ -NH)SHFLK
NEFRD5	AVDLSΨ(CH ₂ -NH)HFLK
NEFRD6	AVDLSHΨ(CH ₂ -NH)FLK
NEFRD7	AVDLSHFΨ(CH ₂ -NH)LK
NEFRD8	AVDLSHFLΨ(CH ₂ -NH)K

	GAG	SLYNTVATL
	GAGRD1	S Ψ (CH ₂ -NH)LYNTVATL
	GAGRD2	SL Ψ (CH ₂ -NH)YNTVATL
5	GAGRD3	SLY Ψ (CH ₂ -NH)NTVATL
	GAGRD4	SLYN Ψ (CH ₂ -NH)TVATL
	GAGRD5	SLYNT Ψ (CH ₂ -NH)VATL
	GAGRD6	SLYNTV Ψ (CH ₂ -NH)ATL
	GAGRD7	SLYNTVA Ψ (CH ₂ -NH)TL
10	GAGRD8	SLYNTVAT Ψ (CH ₂ -NH)L

- ceux dont l'une au moins des liaisons -CO-NH- est remplacée par une liaison -CHOH-NH-, tels que les analogues NEFHEA1-8 du peptide NEF suivants :

15	NEF	AVDLSHFLK
	NEFHEA1	A Ψ (CHOH-NH)VDLSHFLK
	NEFHEA2	AV Ψ (CHOH-NH)DLSHFLK
	NEFHEA3	AVD Ψ (CHOH-NH)LSHFLK
20	NEFHEA4	AVDL Ψ (CHOH-NH)SHFLK
	NEFHEA5	AVDLS Ψ (CHOH-NH)HFLK
	NEFHEA6	AVDLSH Ψ (CHOH-NH)FLK
	NEFHEA7	AVDLSHF Ψ (CHOH-NH)LK
	NEFHEA8	AVDLSHFL Ψ (CHOH-NH)K

25

10. Utilisation d'analogues peptidiques définis dans l'une des revendications 1 à 9, pour la préparation de médicaments, notamment de vaccins, destinés à la prévention ou au traitement des pathologies dans lesquelles les peptides parents sont des agonistes ou antagonistes des récepteurs reconnaissant l'antigène des cellules T cytotoxiques, et plus particulièrement des pathologies neurodégénératives infectieuses (d'origine virale ou bactérienne), tumorales (notamment le mélanome), auto-immunes et allergiques.

30

11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

35

12. Vaccin caractérisé en ce qu'il comprend un analogue peptidique agoniste, le cas échéant partiel, défini dans l'une des revendications 1 à 9, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5 13. Composition de diagnostic pour le diagnostic *in vivo* de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation cellulaire, notamment les lymphocytes T cytotoxiques, ou pour l'évaluation *in vivo* de la réponse immunitaire dans le cadre des pathologies susmentionnées, par mise en oeuvre d'une réaction cutanée d'hypersensibilité par injection intradermique de ladite
10 composition de diagnostic, caractérisée en ce qu'elle comprend un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

14. Complexe entre un analogue peptidique défini dans l'une des
15 revendications 1 à 9, et un élément du complexe d'histocompatibilité majeur (encore désigné complexe binaire MHC-analogue peptidique), et éventuellement un récepteur de cellules T (encore désigné complexe ternaire MHC-analogue peptidique-récepteur T).

20 15. Méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies impliquant la réponse immunitaire à médiation cellulaire, notamment les lymphocytes T cytotoxiques, à savoir de pathologies associées à la présence dans l'organisme d'un patient, de peptides exogènes ou endogènes interagissant avec des molécules du CMH, et susceptibles d'être directement ou indirectement impliqués dans le processus de
25 développement de ces pathologies chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'un échantillon biologique provenant d'un patient, avec un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9, dans des conditions permettant la réaction entre les récepteurs des cellules T susceptibles
30 d'être présentes dans l'échantillon biologique, et le complexe binaire susceptible d'être formé entre ledit analogue peptidique et les molécules du CMH présentes dans ledit échantillon ;

- la détection *in vitro* du complexe ternaire CMH-analogue peptidique peptidique-récepteur T, susceptible d'être formé à l'étape précédente.

35 16. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic *in vitro* selon la revendication 15, comprenant:

- un analogue peptidique défini dans l'une des revendications 1 à 9;

- des réactifs pour rendre un milieu apte à la formation d'une réaction immunologique;

- des réactifs permettant de détecter le complexe ternaire selon la revendication 14, qui a été produit à l'issue de la réaction immunologique, lesdits réactifs contenant éventuellement un marqueur ou étant susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où ledit analogue peptidique n'est pas marqué.

17. Anticorps dirigés contre les complexes binaires tels que définis dans la revendication 14, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un complexe binaire susmentionné, lesdits anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces complexes binaires.

18. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des anticorps selon la revendication 17, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

19. Procédé de criblage d'analogues peptidiques définis dans l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

• incubation pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours, de l'analogue peptidique en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales, sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique,

• addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I,

• détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide,

• évaluation de la durée de l'association entre ledit analogue peptidique et les molécules du CMH.

20. Trousse ou kit pour la mise en oeuvre d'un procédé de criblage selon la revendication 19, comprenant :

- des molécules du CMH, et/ou

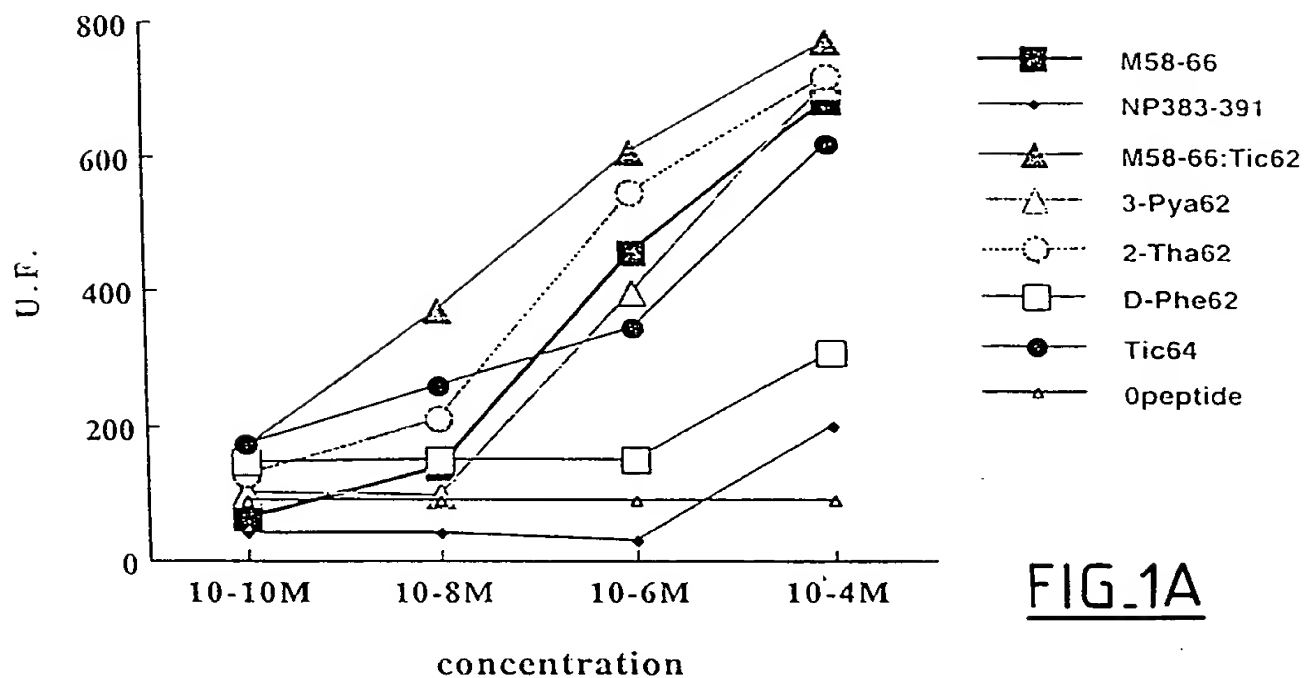
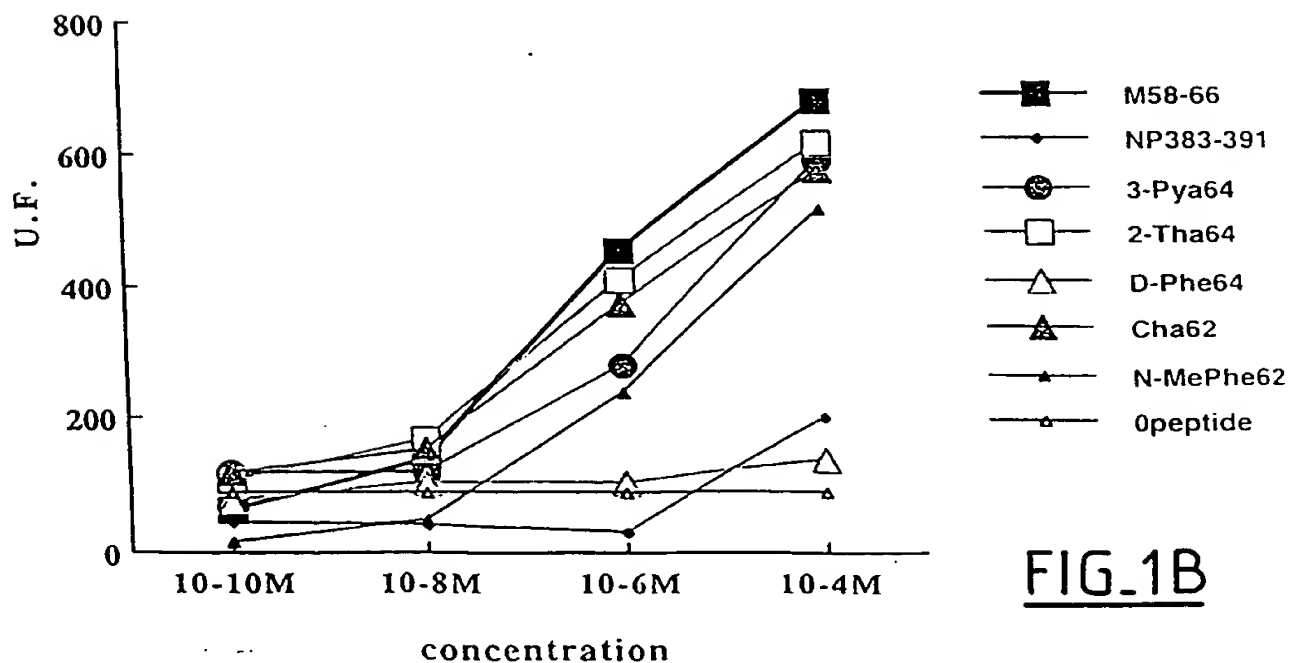
5 - des anticorps, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit analogue peptidique, avantageusement fixés sur un support solide, ou fournis avec les réactifs nécessaires à leur fixation sur le support solide, et/ou

10 - des anticorps marqués, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, reconnaissant spécifiquement soit les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison à l'analogue peptidique, soit une molécule se liant elle-même spécifiquement aux molécules du CMH dans leur conformation susmentionnée, notamment la β 2-microglobuline reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH de classe I, et/ou

15 - un protocole pour la mise en oeuvre dudit procédé, et/ou

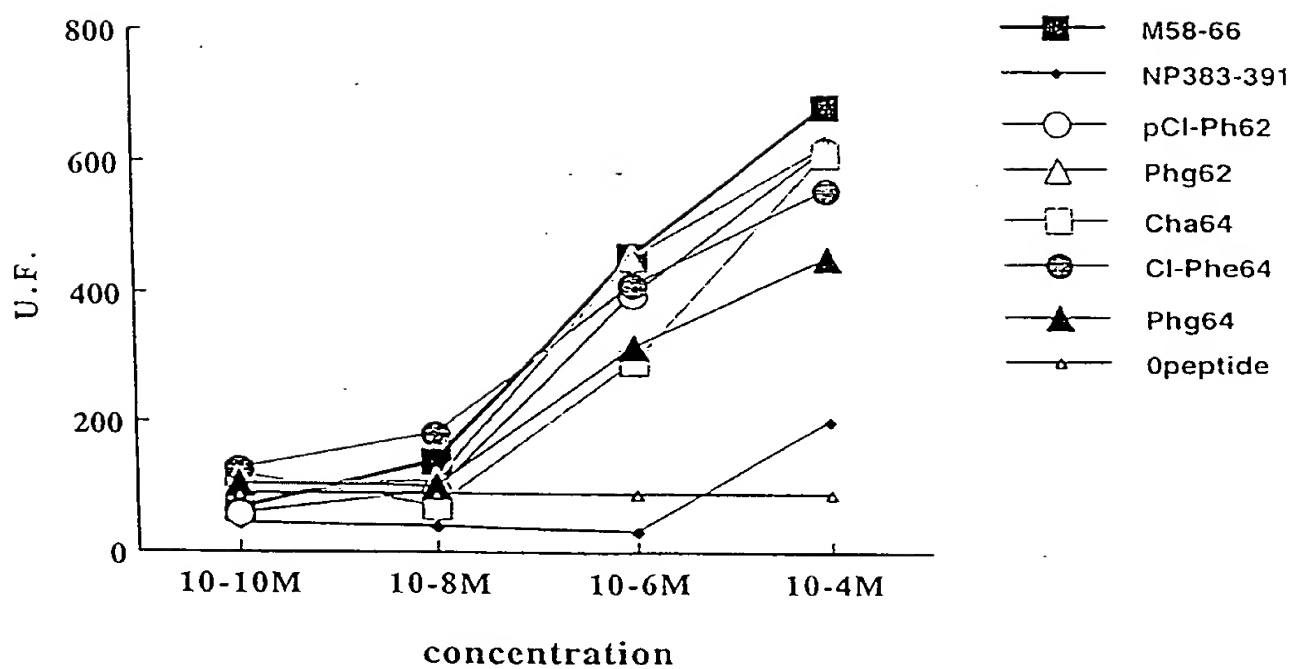
 - un peptide de contrôle.

1 / 15

FIG. 1AFIG. 1B



2 / 15

FIG. 1C



3 / 15

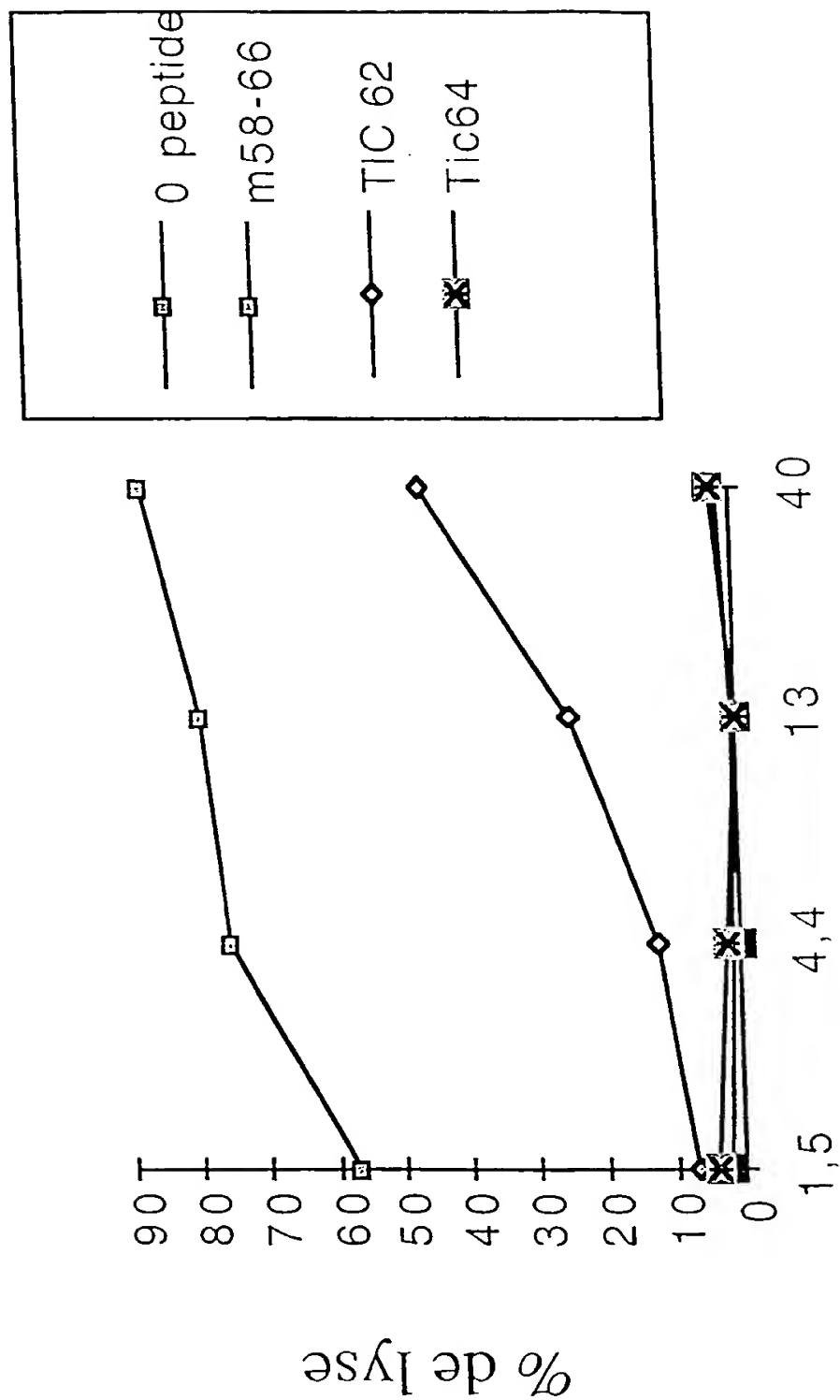
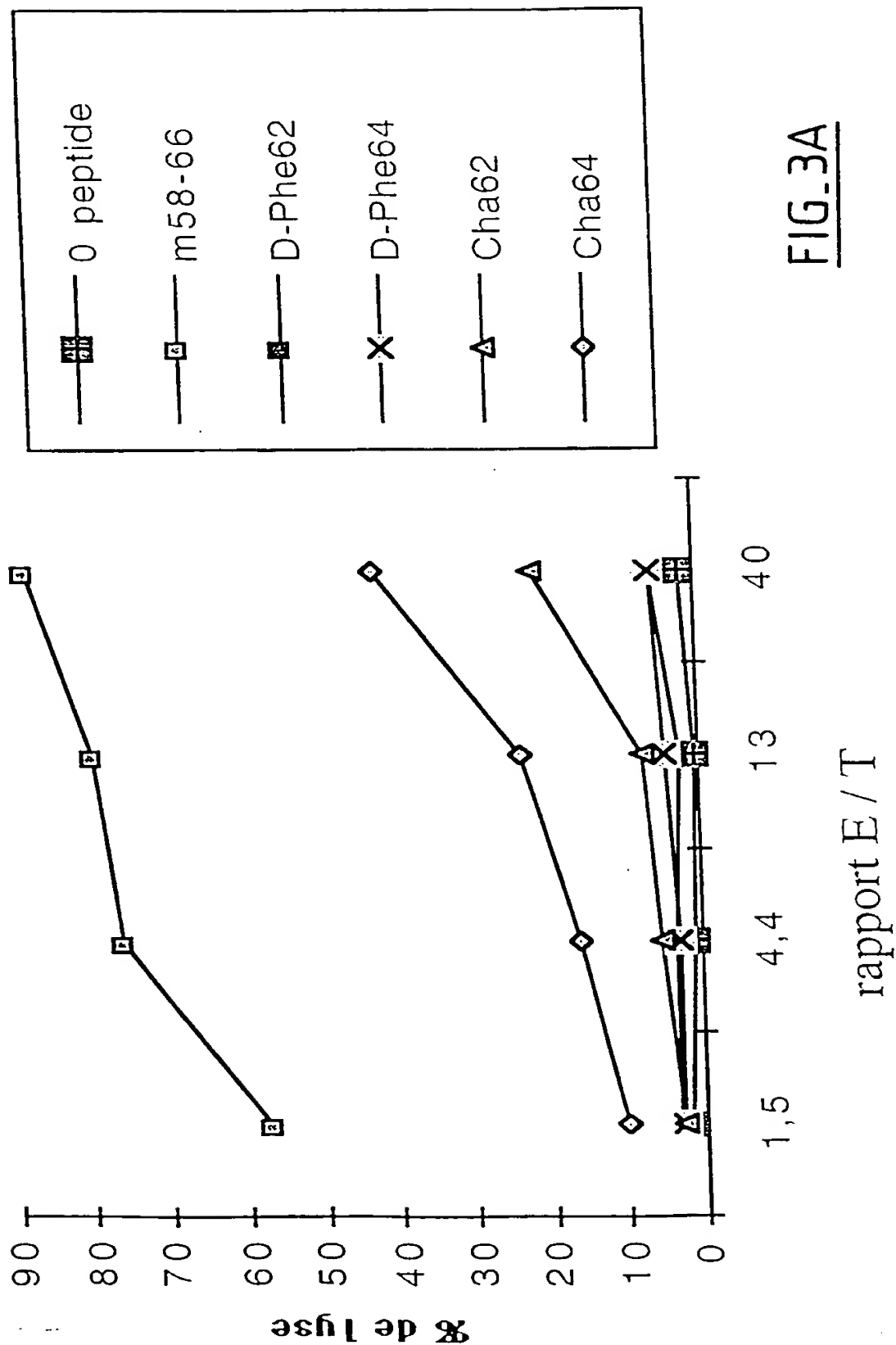


FIG.2A

rapport E / T



4 / 15



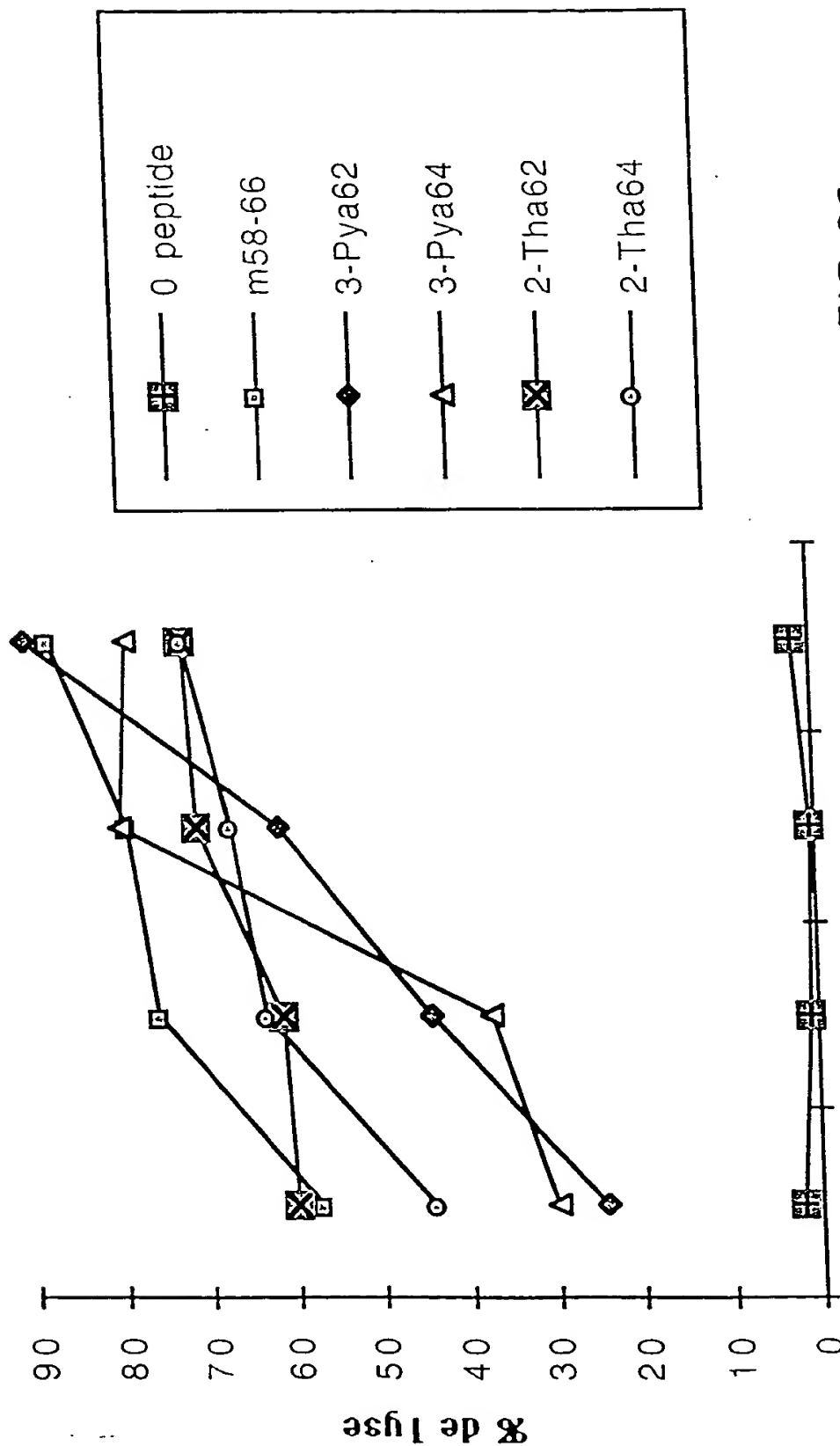


FIG. 2C

rapport E / T

6 / 15

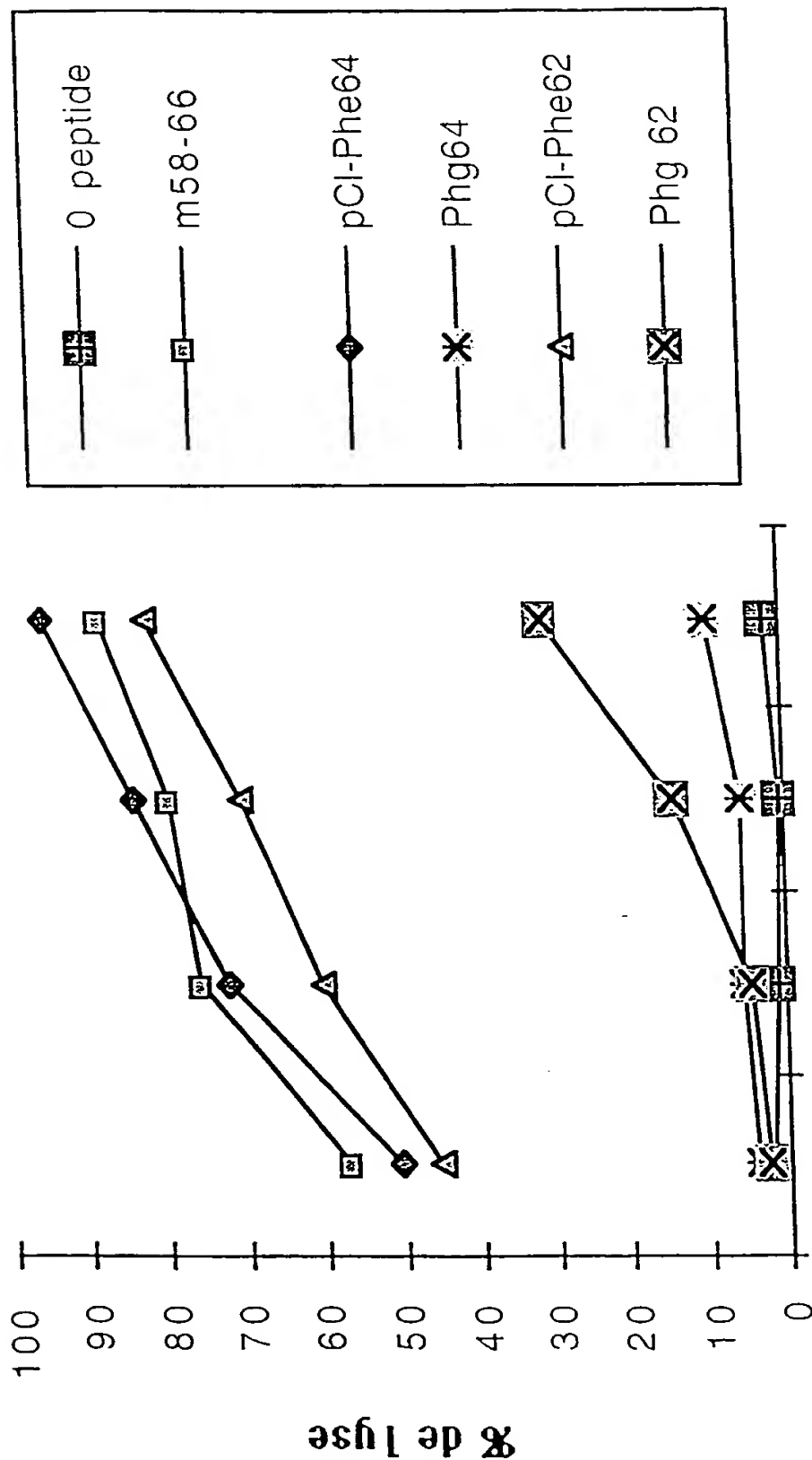


FIG.2D

rapport E / T

7 / 15

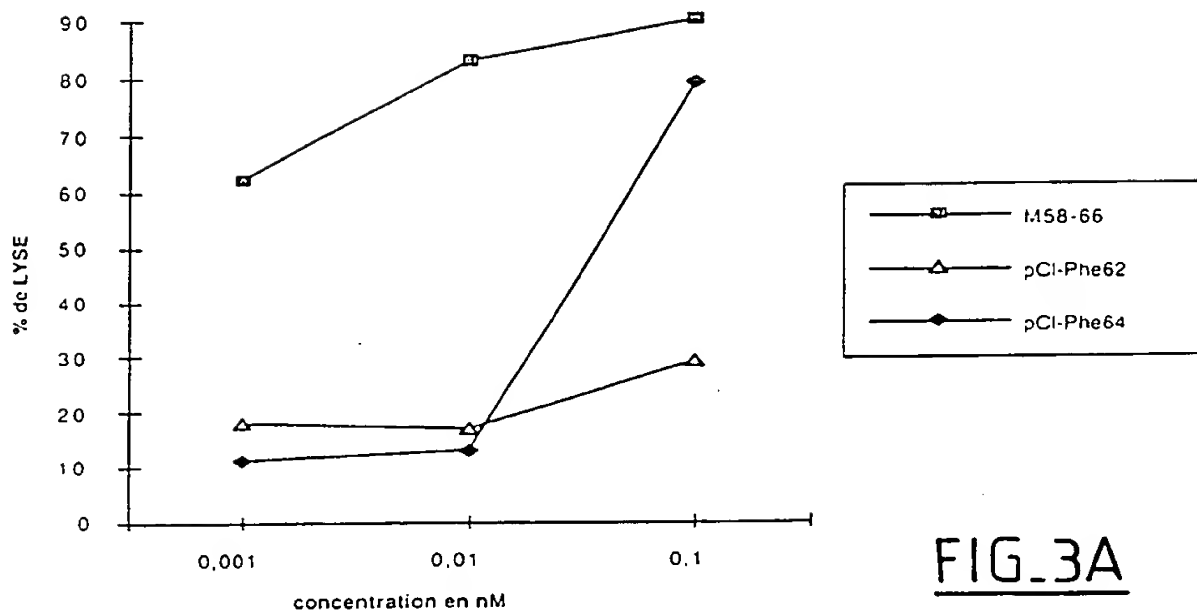
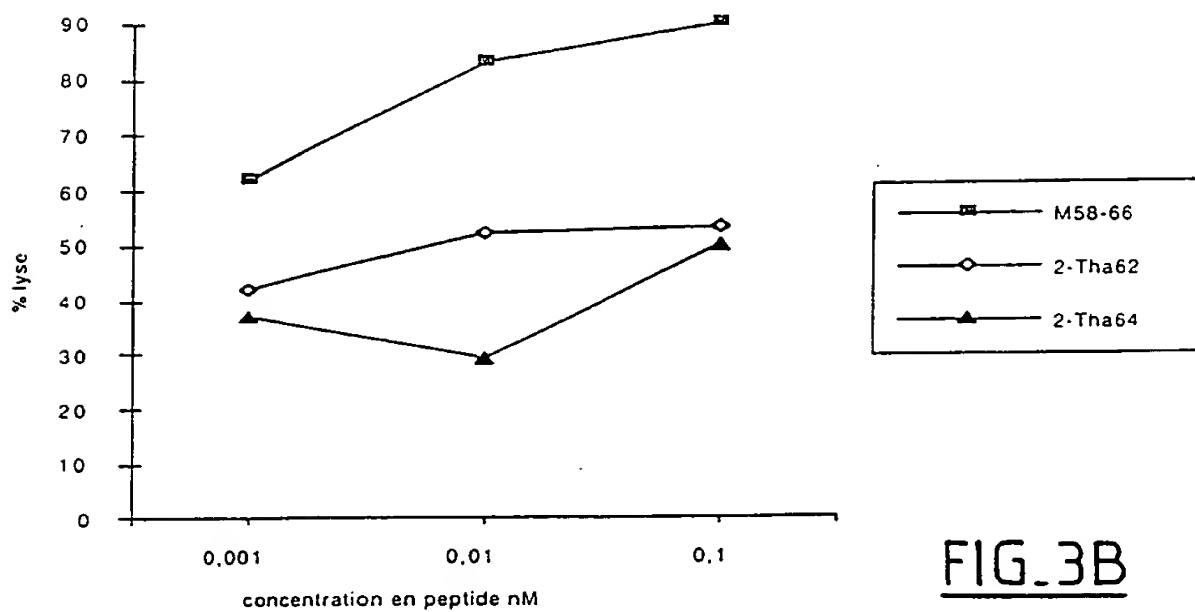
FIG. 3AFIG. 3B

FIG. 4A

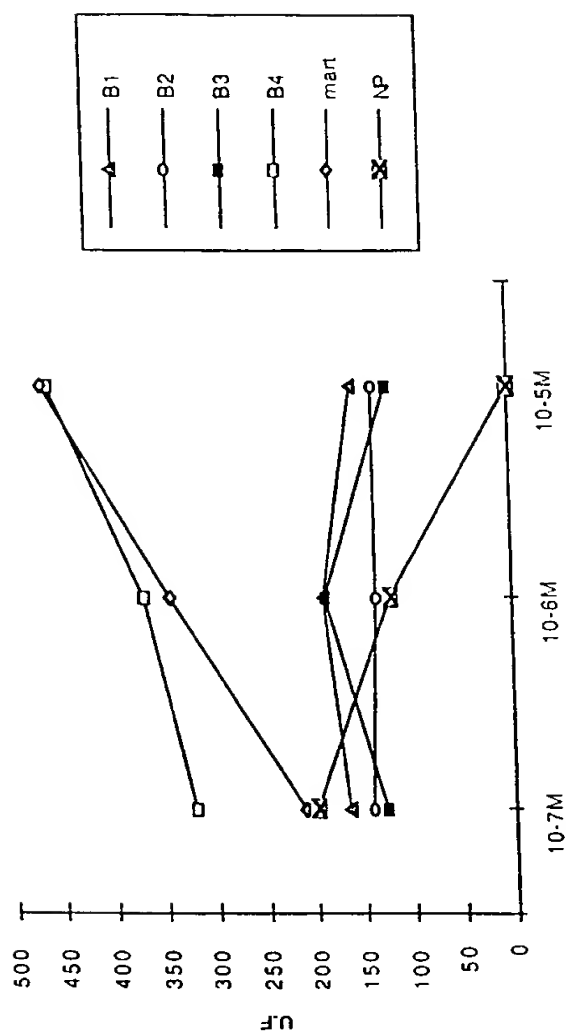
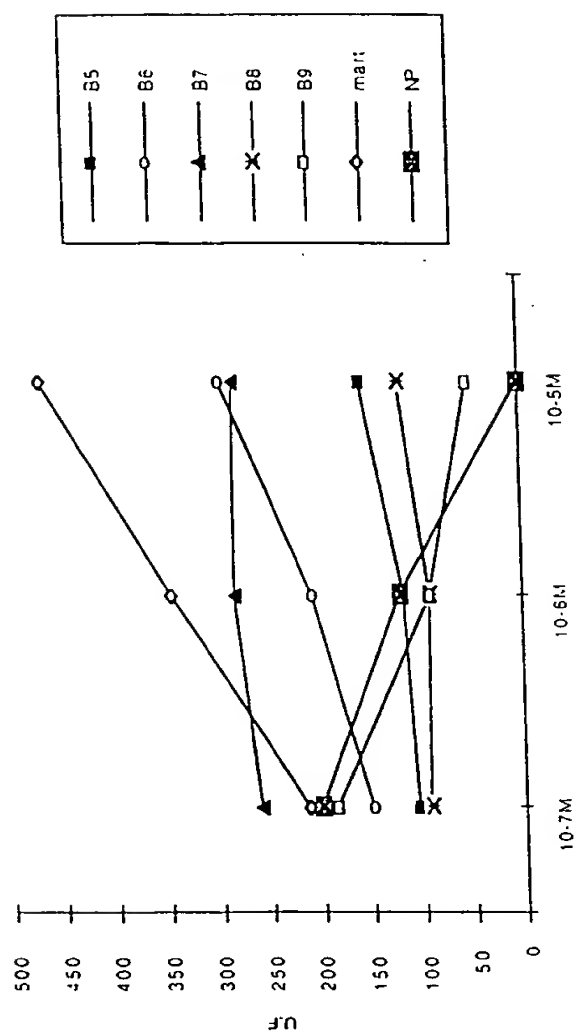


FIG. 4B



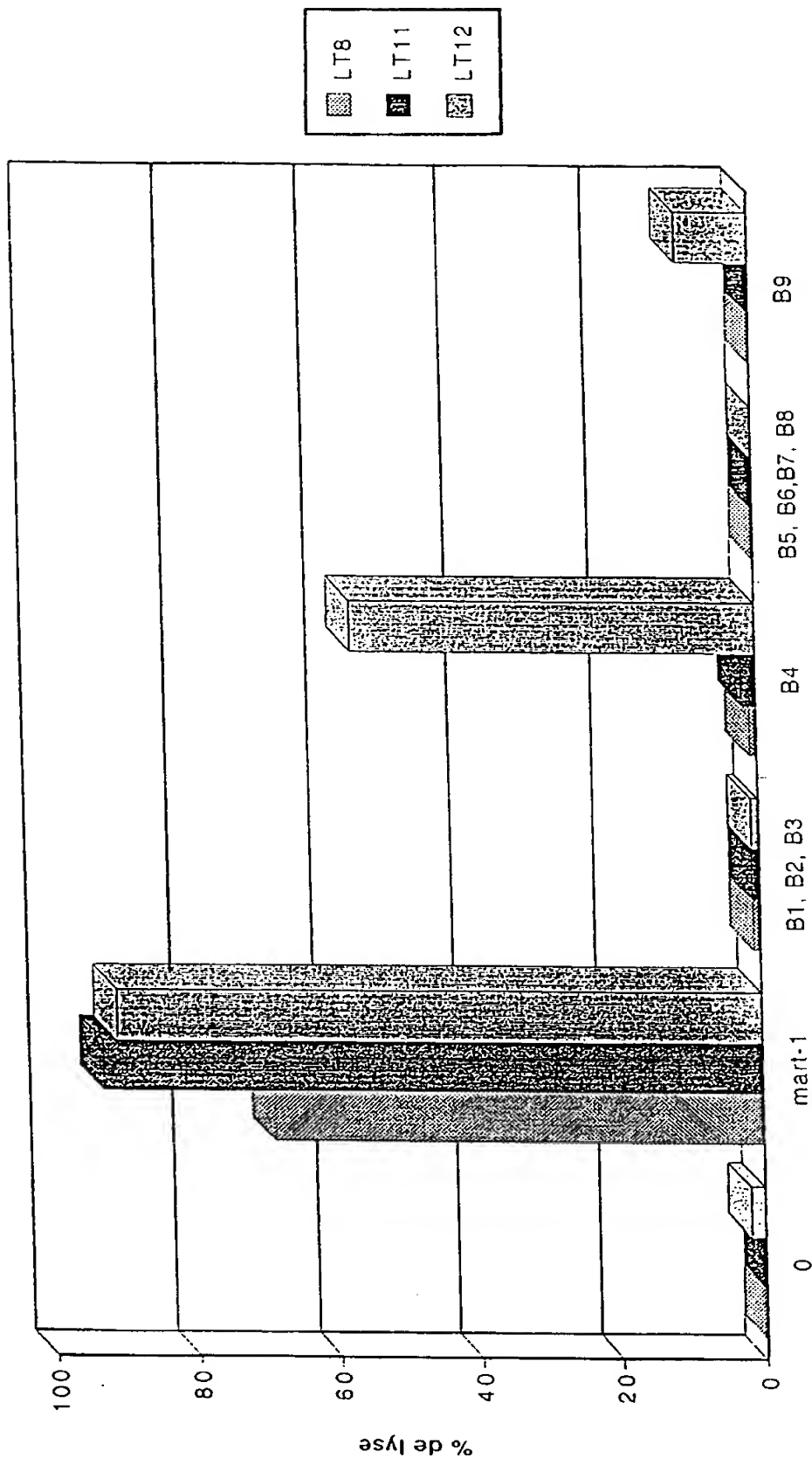
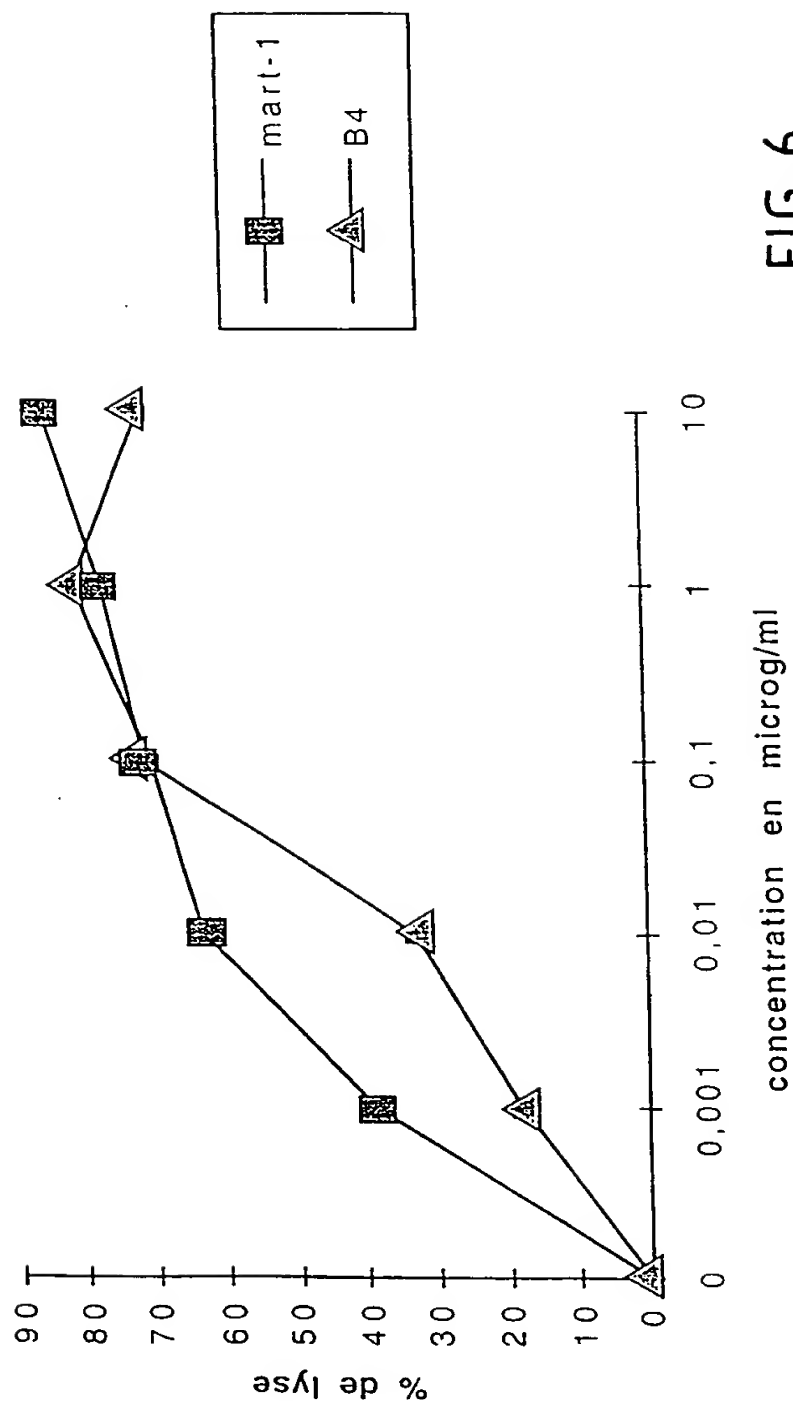
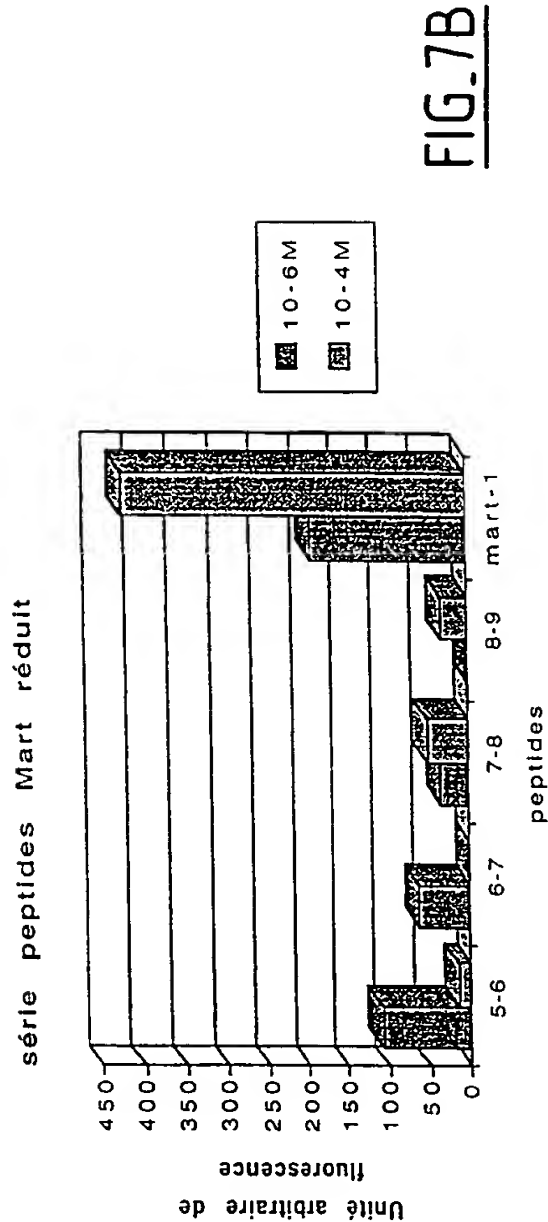
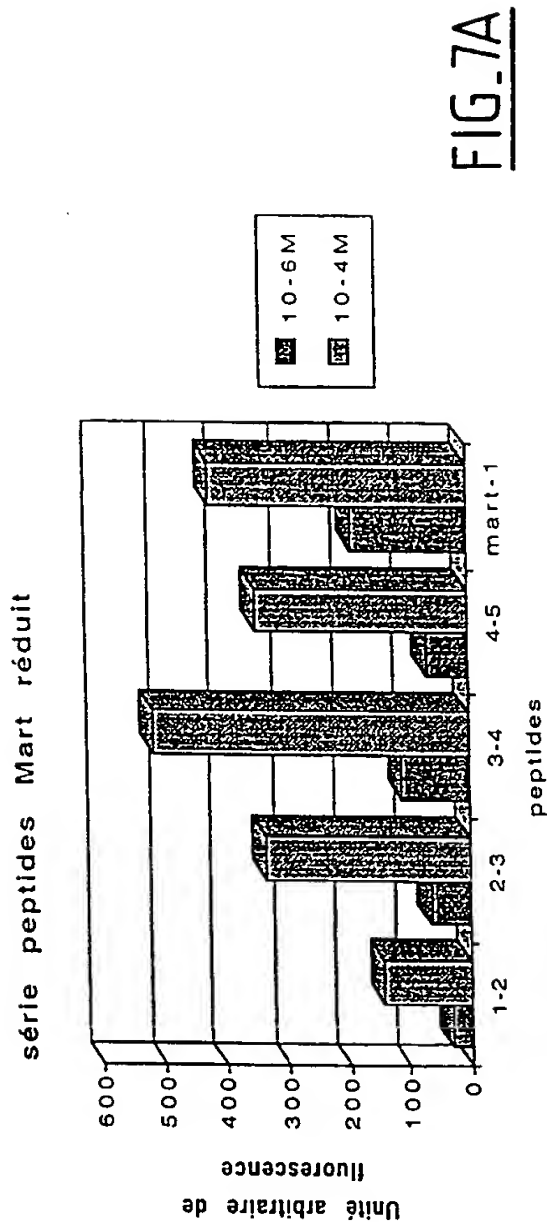


FIG.5

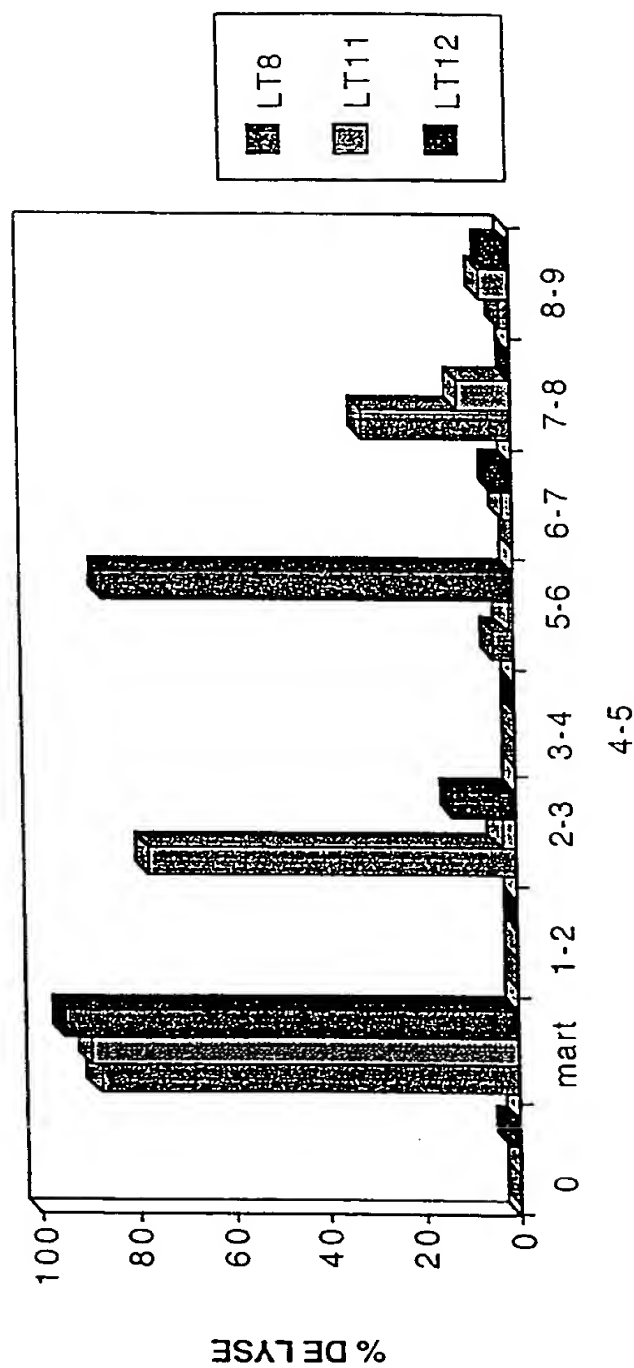
10 / 15



11 / 15



12 / 15



Peptides mart-1 réduits

FIG.8



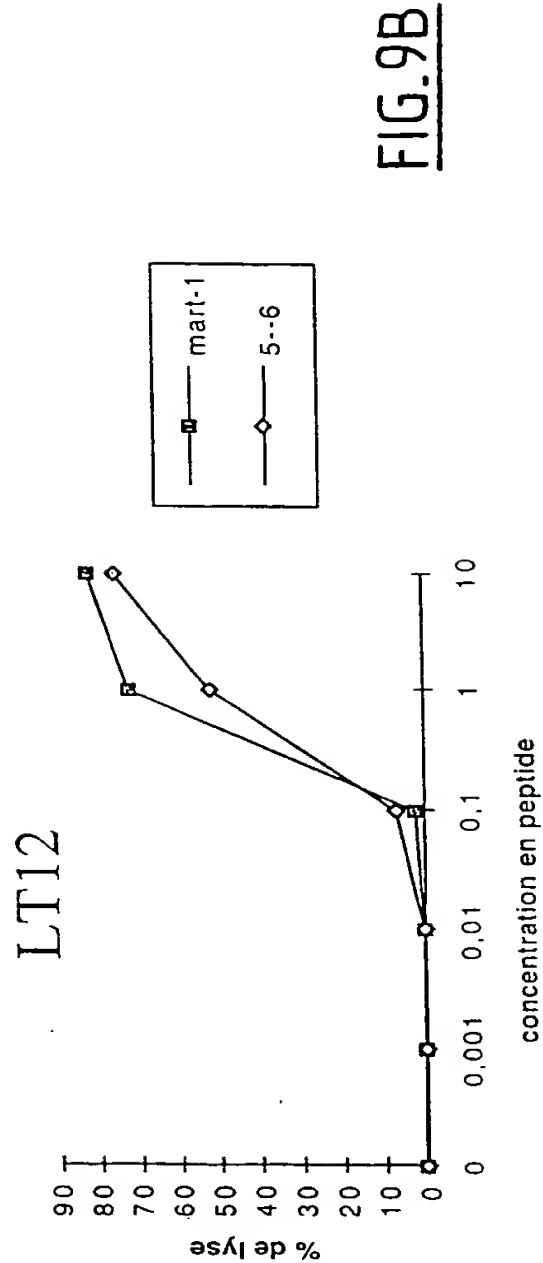
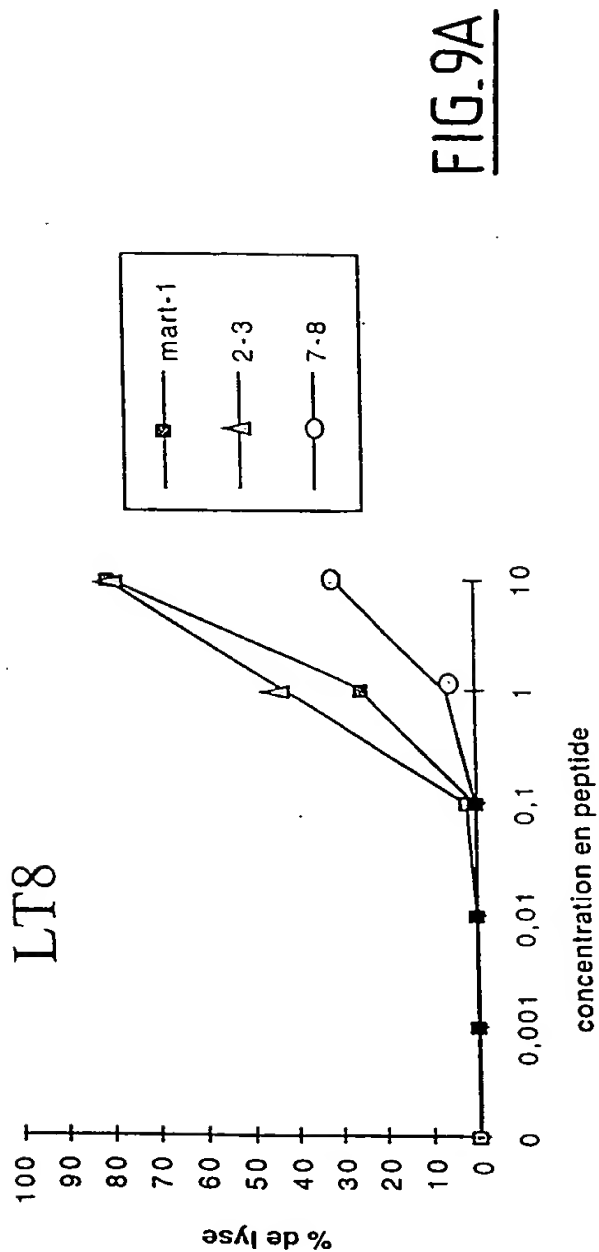
1

2

3

4

13 / 15





7

8

9

10

14 / 15

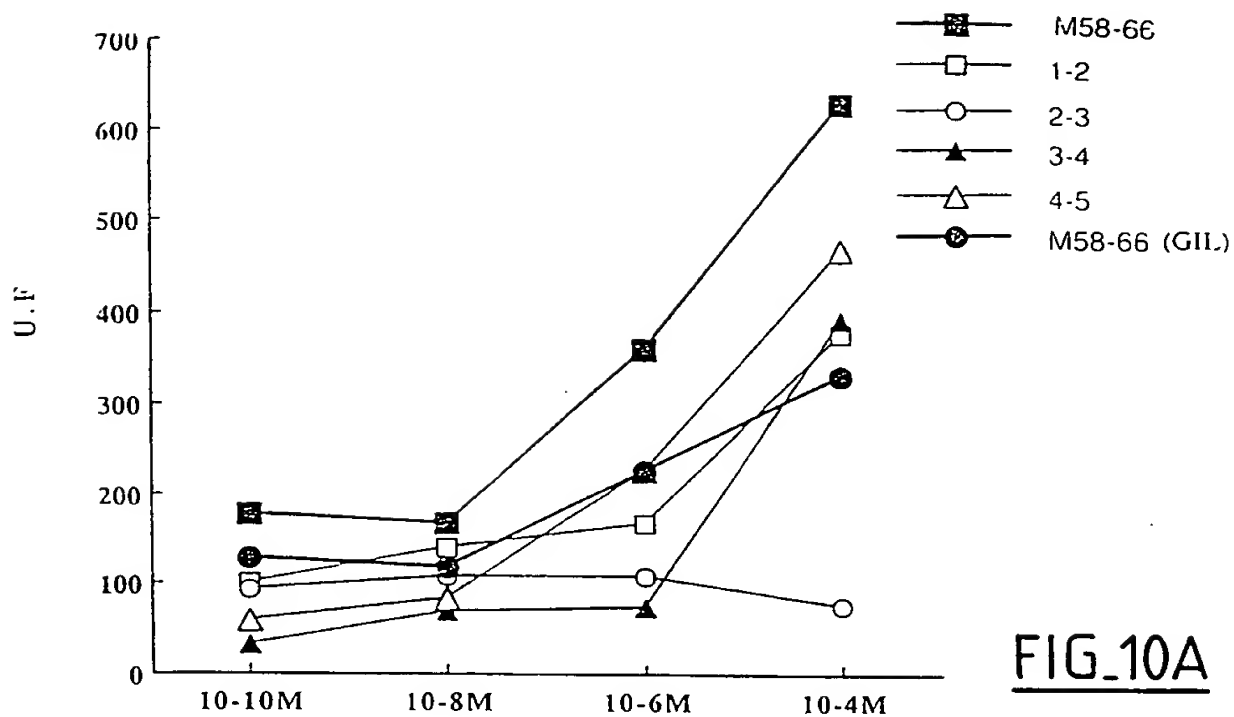


FIG. 10A

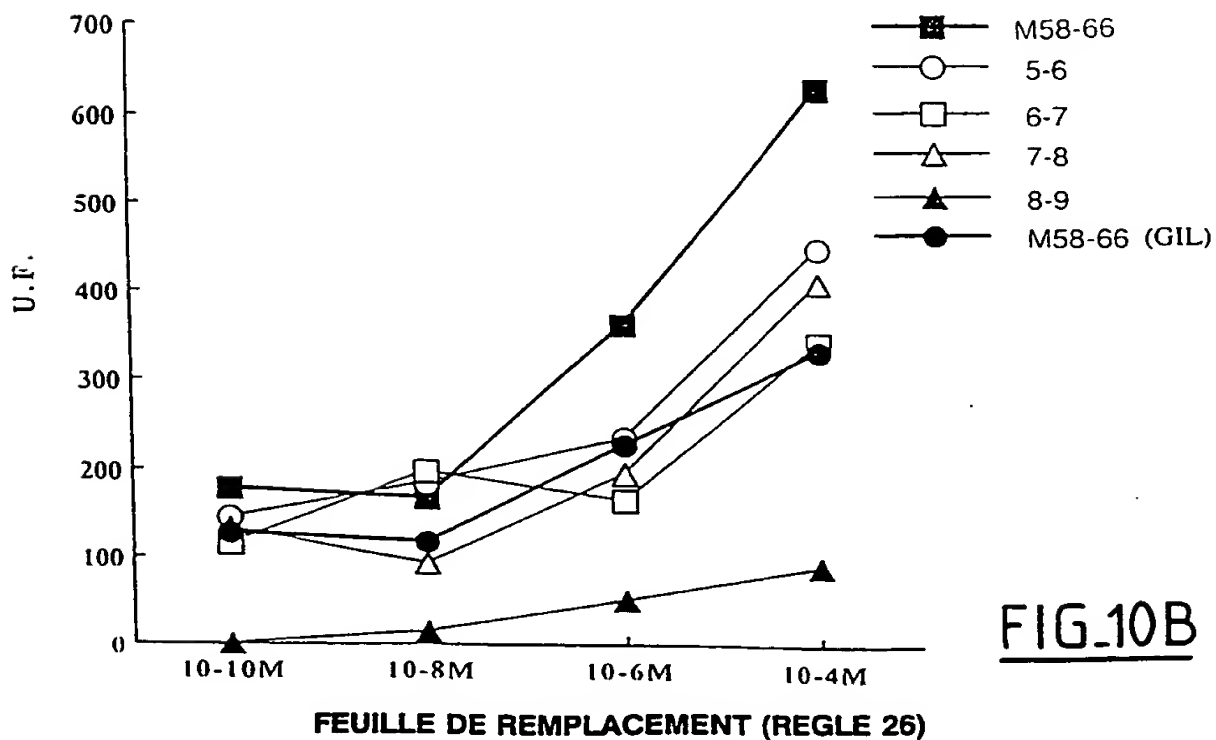
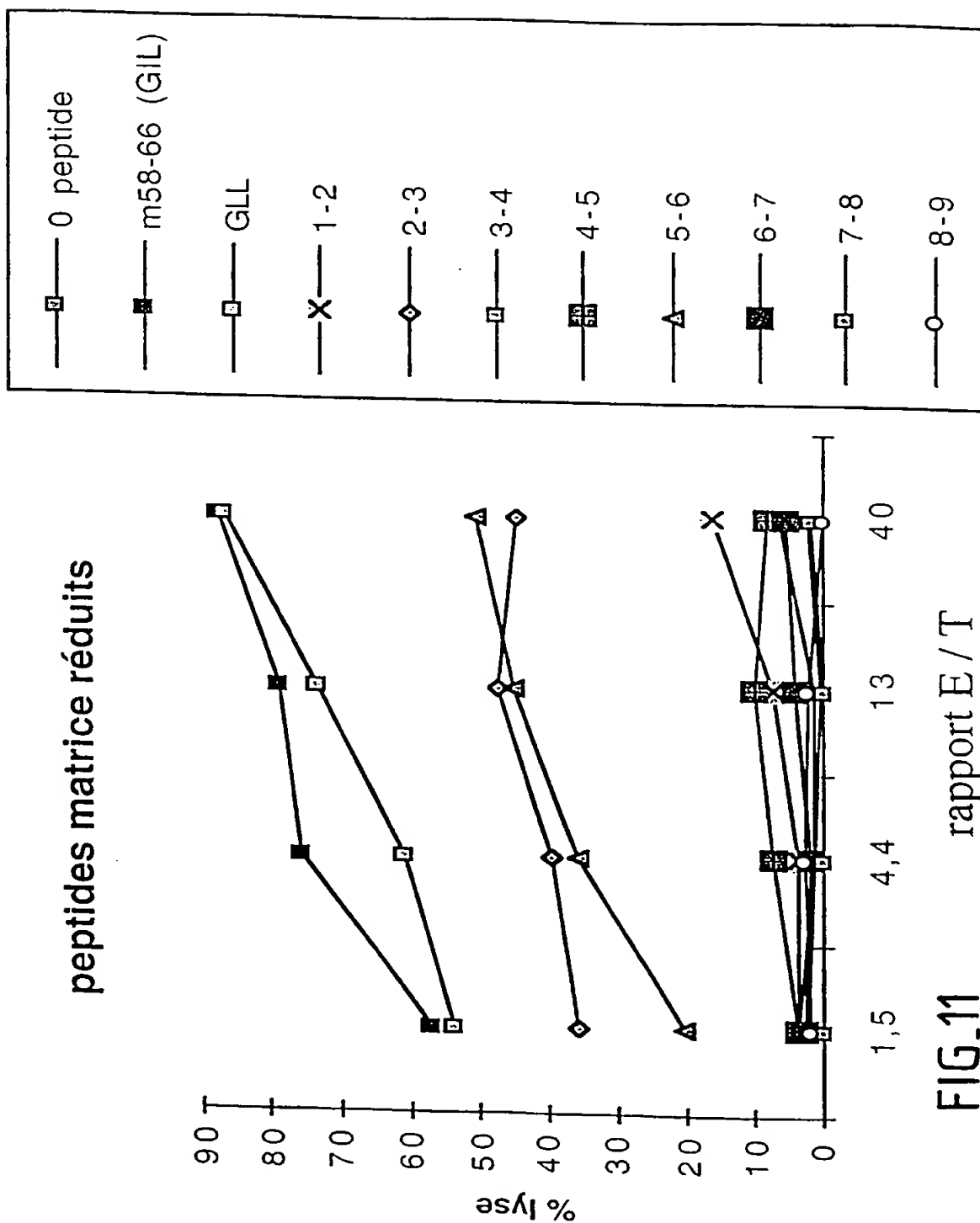


FIG. 10B

15/15

FIG. 11
rapport E / T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 98/00923

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9202543	A	20-02-1992	AU 8305491 A PT 98501 A US 5679640 A	02-03-1992 29-05-1992 21-10-1997
WO 9304080	A	04-03-1993	CA 2094822 A EP 0556405 A JP 6501961 T	27-02-1993 25-08-1993 03-03-1994
WO 9639443	A	12-12-1996	AU 6100196 A	24-12-1996
WO 9405311	A	17-03-1994	AU 667578 B AU 4934693 A BR 9306984 A CA 2143823 A CN 1091138 A EP 0667786 A HU 71860 A JP 8500829 T NZ 255256 A	28-03-1996 29-03-1994 12-01-1999 17-03-1994 24-08-1994 23-08-1995 28-02-1996 30-01-1996 24-02-1997
WO 9524916	A	21-09-1995	FR 2717081 A EP 0750508 A	15-09-1995 02-01-1997
WO 9802538	A	22-01-1998	AU 3693897 A ZA 9705858 A	09-02-1998 01-09-1998
WO 9529193	A	02-11-1995	US 5874560 A US 5844075 A AU 2395895 A CA 2188432 A EP 0756604 A FI 964235 A JP 10505481 T	23-02-1999 01-12-1998 16-11-1995 02-11-1995 05-02-1997 20-12-1996 02-06-1998
WO 9734613	A	25-09-1997	AU 2424397 A CA 2249390 A EP 0921805 A	10-10-1997 25-09-1997 16-06-1999
WO 9523166	A	31-08-1995	AU 699757 B AU 1748695 A CA 2183977 A EP 0751960 A JP 9509182 T ZA 9501591 A	17-12-1998 11-09-1995 31-08-1995 08-01-1997 16-09-1997 08-12-1995

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-7 10-20

Revendications 1-6 (partiellement); Revendication 7; revendications 10-20 (partiellement): Analogues peptidiques de Mart1 7-35; utilisation pour la préparation d'un médicament; compositions pharmaceutiques ou diagnostic ou vaccins ou complexes les contenant, anticorps contre les analogues sus-mentionnés, et méthodes et kit pour utiliser les analogues.

2. revendications: 1-6,8,10-20

Revendications 1-6 (partiellement); Revendication 8; revendications 10-20 (partiellement): Analogues peptidiques de M58-66 (peptide antigénique du virus de la grippe); utilisation pour la préparation d'un médicament; compositions pharmaceutiques ou diagnostic ou vaccins ou complexes les contenant, anticorps contre les analogues sus-mentionnés, et méthodes et kit pour utiliser les analogues.

3. revendications: 1-6,9-20

Revendications 1-6 (partiellement); Revendication 9; revendications 10-20 (partiellement): Les analogues peptidiques de NEF 84-92 et GAG 77-85 (peptides antigéniques du virus du SIDA; utilisation pour la préparation d'un médicament; compositions pharmaceutiques ou diagnostic ou vaccins ou complexes les contenant, anticorps contre les analogues sus-mentionnées, et méthodes et kit pour utiliser les analogues.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 98/00923

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os}
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os}
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os}
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☒ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Je Internationale No

PCT/FR 98/00923

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 24916 A (CENTRE NAT RECH SCIENT ;GUICHARD GILLES (FR); MULLER SYLVIANE (FR)) 21 septembre 1995 cité dans la demande voir le document en entier ----	1
P,A	WO 98 02538 A (AKZO NOBEL NV ;FIGDOR CARL GUSTAV (NL); ADEMA GOSSE JAN (NL)) 22 janvier 1998 voir revendications; exemples ----	1-8
X	WO 95 29193 A (US HEALTH) 2 novembre 1995 voir page 12, ligne 4 - ligne 30; revendications ----	1-8, 10-20
P,X	WO 97 34613 A (UNIV VIRGINIA) 25 septembre 1997 voir page 20, ligne 32 - page 25, ligne 38; revendications; exemples; tableau A ----	1-8, 10-20
X	WO 95 23166 A (DEAKIN RES LTD ;COMIS ALFIO (AU); TYLER MARGARET ISABEL (AU); FISC) 31 août 1995 voir page 6, ligne 38 - page 8, ligne 4; revendications voir page 8, ligne 19 - ligne 22 -----	1,8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 98/00923

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>GUICHARD, GILLES ET AL: "Efficient binding of reduced peptide bond pseudopeptides to major histocompatibility complex class I molecule"</p> <p>J. BIOL. CHEM. (1995), 270(44), 26057-9</p> <p>CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, 1995, XP002053877</p> <p>voir page 26059, colonne de gauche, alinéa 3 - colonne de droite, alinéa 1</p> <p>---</p>	1-7, 10-20
X	<p>GUICHARD, G. ET AL: "Synthesis and antigenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogs of a histone H3 hexapeptide"</p> <p>PEPT. RES. (1994), 7(6), 308-21 CODEN: PEREEO; ISSN: 1040-5704, 1994, XP002053878</p> <p>voir page 319, colonne de droite, alinéa 2 - page 321, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p>---</p>	1-7, 10-20
X	<p>C.M. HILL ET AL.: "Exploration of Requirements for Peptide Binding to HLA DRB1*0101 and DRB*0401"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 152, no. 6, 15 mars 1994, pages 2890-2898, XP002053879</p> <p>BALTIMORE US</p> <p>voir page 2896, colonne de droite, alinéa 2 - page 2898, colonne de gauche, alinéa 1; tableaux IV, VI, VII</p> <p>---</p>	1-7, 10-20
X	<p>WO 92 02543 A (CYTEL CORP ; SANDOZ LTD (CH); SANDOZ AG (DE)) 20 février 1992</p> <p>voir page 7, alinéa 3 - page 9, alinéa 1</p> <p>voir page 15, alinéa 2 - page 17, alinéa 2; revendications; exemples</p> <p>---</p>	1-7, 10-20
X	<p>WO 93 04080 A (JAPAN TOBACCO INC) 4 mars 1993</p> <p>voir page 7, ligne 17 - page 8, ligne 19</p> <p>voir page 34, ligne 20 - page 38, ligne 3; revendications</p> <p>---</p>	1-7
X	<p>WO 96 39443 A (IGEN INC) 12 décembre 1996</p> <p>voir page 7, ligne 10 - page 10, ligne 36; revendications; exemples</p> <p>---</p>	1-7
X	<p>WO 94 05311 A (DEAKIN RES LTD ; COMIS ALFIO (AU); FISCHER PETER (NO); TYLER MARGAR) 17 mars 1994</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 98/00923

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K14/47 C07K14/11 A61K39/145 A61K38/17 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BENKIRANE, NADIA ET AL: "Exploration of requirements for peptidomimetic immune recognition. Antigenic and immunogenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogs of a histone hexapeptide"</p> <p>J. BIOL. CHEM. (1996), 271(52), 33218-33224 CODEN: JBCHA3;ISSN: 0021-9258, 1996, XP002053876</p> <p>voir page 33221, colonne de droite, alinéa 2 - page 33224, colonne de gauche, alinéa 2</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-7, 10-20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 juin 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07. 07. 1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Patent Application No

PCT/FR 98/00923

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9202543 A	20-02-1992	AU 8305491 A	02-03-1992
		PT 98501 A	29-05-1992
		US 5679640 A	21-10-1997
WO 9304080 A	04-03-1993	CA 2094822 A	27-02-1993
		EP 0556405 A	25-08-1993
		JP 6501961 T	03-03-1994
WO 9639443 A	12-12-1996	AU 6100196 A	24-12-1996
WO 9405311 A	17-03-1994	AU 667578 B	28-03-1996
		AU 4934693 A	29-03-1994
		BR 9306984 A	12-01-1999
		CA 2143823 A	17-03-1994
		CN 1091138 A	24-08-1994
		EP 0667786 A	23-08-1995
		HU 71860 A	28-02-1996
		JP 8500829 T	30-01-1996
		NZ 255256 A	24-02-1997
WO 9524916 A	21-09-1995	FR 2717081 A	15-09-1995
		EP 0750508 A	02-01-1997
WO 9802538 A	22-01-1998	AU 3693897 A	09-02-1998
		ZA 9705858 A	01-09-1998
WO 9529193 A	02-11-1995	US 5874560 A	23-02-1999
		US 5844075 A	01-12-1998
		AU 2395895 A	16-11-1995
		CA 2188432 A	02-11-1995
		EP 0756604 A	05-02-1997
		FI 964235 A	20-12-1996
		JP 10505481 T	02-06-1998
WO 9734613 A	25-09-1997	AU 2424397 A	10-10-1997
		CA 2249390 A	25-09-1997
		EP 0921805 A	16-06-1999
WO 9523166 A	31-08-1995	AU 699757 B	17-12-1998
		AU 1748695 A	11-09-1995
		CA 2183977 A	31-08-1995
		EP 0751960 A	08-01-1997
		JP 9509182 T	16-09-1997
		ZA 9501591 A	08-12-1995

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-7, 10-20

Claims 1-6 (partially); Claim 7; Claims 10-20 (partially): MartI 7-35 peptide analogues; use for preparing a medicine; pharmaceutical or diagnostic or vaccine compositions or complexes containing same, antibodies against said analogues, and methods and kit for using said analogues.

2. Claims: 1-6, 8, 10-20

Claims 1-6 (partially); Claim 3; Claims 10-20 (partially): M58-66 peptide analogues (peptide antigenic of the influenza virus); use for preparing a medicine; pharmaceutical or diagnostic or vaccine compositions or complexes containing same, antibodies against said analogues, and methods and kit for using said analogues.

3. Claims 1-6, 9-20

Claims 1-6 (partially); Claim 9; Claims 10-20 (partially): NEF 84-92 and GAG 77-85 peptide analogues (peptides antigenic of the SIDA virus); use for preparing a medicine; pharmaceutical or diagnostic or vaccine compositions or complexes containing same, antibodies against said analogues, methods and kit for using said analogues.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00923

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplementary sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/ 00923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 24916 A (CENTRE NAT RECH SCIENT; GUICHARD GILLES (FR); MULLER SYLVIANE (FR)) 21 September 1995 (21.09.95) cited in the application see the whole document	1
P, A	WO 98 02538 A (AKZO NOBEL NV; FIGDOR CARL GUSTAV (NL); ADEMA GOSSE JAN (NL)) 22 January 1998 (22.01.98) see claims; examples	1-8
X	WO 95 29193 A (US HEALTH) 2 November 1995 (02.11.95) see page 12, line 4 - line 30; claims	1-8 10-20
P, X	WO 97 34613 A (UNIV VIRGINIA) 25 September 1997 (25.09.97) see page 20, line 32 - page 25, line 38; claims; examples; board A	1-8 10-20
X	WO 95 23166 A (DEAKIN RES LTD ;COMIS ALFIO (AU); TYLER MARGARET ISABEL (AU); FISC) 31 August 1995 (21.08.95) see page 6, line 38 - page 8, line 4; claims see page 8, line 19 - line 22	1,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GUICHARD, GILLES ET AL: "Efficient binding of reduced peptide bond pseudopeptides to major histocompatibility complex class I molecule"</p> <p>J. BIOL. CHEM. (1995), 270(44), 26057-9</p> <p>CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, 1995, XP002053877</p> <p>see page 26059, left column, paragraph 3 - right column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7, 10-20
X	<p>GUICHARD, G. ET AL: "Synthesis and antigenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogs of a histone H3 hexapeptide"</p> <p>PEPT. RES. (1994), 7(6), 308-21 CODEN: PEREEO; ISSN: 1040-5704, 1994, XP002053878</p> <p>see page 319, right column, paragraph 2 - page 321, left column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7, 10-20
X	<p>C.M. HILL ET AL.: "Exploration of Requirements for Peptide Binding to HLA DRB1*0101 and DRB*0401"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 152, no. 6, 15 March 1994, pages 2890-2898, XP002053879</p> <p>BALTIMORE US</p> <p>see page 2896, right column, paragraph 2 - page 2898, left column, paragraph 1; boards IV, VI, VII</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7, 10-20
X	<p>WO 92 02543 A (CYTEL CORP; SANDOZ LTD (CH); SANDOZ AG (DE)) 20 February 1992 (20.02.92)</p> <p>see page 7, paragraph 3 - page 9, paragraph 1</p> <p>see page 15, paragraph 2 - page 17, paragraph 2; claims; examples</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7 10-20
X	<p>WO 93 04080 A (JAPAN TOBACCO INC) 4 March 1993 (04.03.93)</p> <p>see page 7, line 17 - page 8, line 19</p> <p>see page 34, line 20 - page 38, line 3; claims</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7
X	<p>WO 96 39443 A (IGEN INC) 12 December 1996 (12.12.96)</p> <p>see page 7, line 10 - page 10, line 36; claims; examples</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-7
X	<p>WO 94 05311 A (DEAKIN RES LTD; COMIS ALFIO (AU); FISCHER PETER (NO); TYLER MARGAR) 17 March 1994 (17.03.94)</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
CIB 6 C07K14/47 C07K14/11 A61K39/145 A61K38/17 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
CIB 6 C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BENKIRANE, NADIA ET AL: "Exploration of requirements for peptidomimetic immune recognition. Antigenic and immunogenic properties of reduced peptide bond pseudopeptide analogs of a histone hexapeptide" J. BIOL. CHEM. (1996), 271(52), 33218-33224 CODEN: JBCHA3;ISSN: 0021-9258, 1996, XP002053876 see page 33221, right column, paragraph 2 - page 33224, left column, paragraph 2	1-7, 10-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 June 1999 (24.06.99)		07 July 1999 (07.07.99)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.